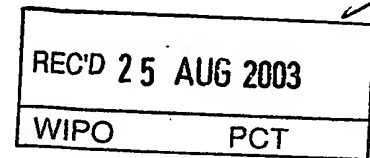


13 AUG 2003



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 30 220.0

**Anmeldetag:** 04. Juli 2002

**Anmelder/Inhaber:** SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz  
in Pflanzen

**IPC:** A 01 H, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juni 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

terofsky

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

## Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogen-induzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

- 10 Palatinose (Isomaltulose) und Trehalulose werden großtechnisch aus Saccharose durch eine enzymatische Umlagerung unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen hergestellt. Dabei wird die zwischen den Monosacchariden des Disaccharids Saccharose bestehende ( $\alpha$ 1- $\rightarrow$  $\beta$ 2-glykosidische Bindung zu einer  $\alpha$ 1- $\rightarrow$  $\alpha$ 6-Bindung
- 15 bei Palatinose bzw. einer  $\alpha$ 1- $\rightarrow$  $\alpha$ 1-Bindung bei Trehalulose isomerisiert. Diese Umlagerung von Saccharose zu den beiden nicht-kariogenen Disacchariden erfolgt unter Katalyse des bakteriellen Enzyms Saccharoseisomerase, auch Saccharosemutase genannt. Entsprechende Sequenzen sind beispielsweise in WO 95/20047
- 20 (US 5,786,140; US 5,985,622) beschrieben.

- Ferner sind beschrieben Saccharoseisomerasen aus *Erwinia rhapontici* (palI Gen, GenBank Acc.-No.: AF279281; Börnke et al. (2001) J Bacteriol 183(8):2425-2430) und *Klebsiella* sp. Strain
- 25 LX3 (GenBank Acc.-No.: AY040843; Zhang et al. (2002) Appl Environ Microbiol (68):2676-2682).

- WO 01/59136 beschreibt Verfahren zur direkten Herstellung nicht-kariogener Zucker direkt in transgenen Pflanzen, die rekombinante
- 30 Nukleinsäuremoleküle kodierend für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Saccharoseisomerase enthalten. Beschrieben sind Expressionskonstrukte für besagte Saccharoseisomerase zur Expression in Pflanzen, sowie die mit denselben transformierten transgenen Pflanzen.

35

- WO 01/59135 beschreibt Verfahren zur Beeinflussung der Pollenentwicklung unter Verwendung von antheren-, tapetum oder pollen-spezifisch exprimierten Saccharoseisomerasen. Die konstitutive Expression der Saccharoseisomerase in Pflanzen hat jedoch nach-
- 40 teilige Wirkung auf das Wachstum der Pflanze (Börnke F et al. (2002) Planta 214:356-364).

- Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel
- 45 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehr-

## 2

- mechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken.
- 5 Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen unter Kontrolle des 35 S CaMV Promoters (Vaech et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promoters
- 10 (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.
- 15 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endo-
- 20 genen Botenstoffen wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward, et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes, et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-
- 25 S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J. 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
- 30 In Gerste ist bereits seit längerem der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und vor allem rassen-unspezifische Resistenz beispielsweise gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Das Mlo-
- 35 Gen wurde erst kürzlich kloniert (Büschges R et al. (1997) Cell :695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung von Mlo-Genen zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Unklar ist, ob ein Mlo-basierter Ansatz auch in dikotyledonen Pflanzen praktikabel ist.

Generell leben pflanzenpathogene Pilzarten saprophytisch oder parasitisch. Letztere sind - zumindest in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus - auf ein Wirkstoffangebot (z.B. ein Angebot an Vitaminen, Kohlenhydraten usw.) angewiesen, wie es in dieser Form  
5 nur von lebenden Pflanzenzellen bereitgestellt werden kann. Der Fachmann unterscheidet parasitäre Pilze in nekrotrophe, hemibiotrophe und biotrophe. Bei nekrotrophen pilzlichen Parasiten führt die Infektion zur Gewebeerstörung und damit zum Tod der Pflanze. Diese Pilze sind meist nur fakultativ parasitär; sie können sich  
10 ebenso gut saprophytisch in totem oder absterbendem Pflanzenmaterial vermehren.

Biotrophe pilzliche Parasiten sind dadurch charakterisiert, dass Parasit und Wirt, zumindest über längere Zeiträume hinweg,  
15 zusammenleben. Der Pilz entnimmt dem Wirt Nährstoffe, tötet ihn jedoch nicht ab. Die meisten biotrophen Pilze sind obligate Parasiten. Hemibiotrophe Pilze leben zeitweise biotroph und töten den Wirt zu einem späteren Zeitpunkt ab, d.h. sie wechseln in eine nekrotrophe Phase.

20

Einer weitere große Gruppe biotropher pflanzlicher Pathogene von enormer agro-ökonomischer Bedeutung stellen Nematoden dar. Pflanzenpathogene Nematoden entnehmen ihre Nahrung aus den äußeren pflanzlichen Gewebeabschnitten (Ektoparasiten) oder nach  
25 dem Eindringen in die Pflanze aus tiefer liegenden Zellschichten (Endoparasiten). Bei den endoparasitären Wurzel nematoden unterscheidet man nach ihrer Lebens- und Ernährungsweisen zwischen zwei Gruppen: Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) und Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten). Bei  
30 beiden Gruppen handelt es sich um obligate biotrophe Parasiten, die in den Wurzeln die Bildung spezieller Nährzellen induzieren. Bei diesen Nährzellen handelt es sich um Pflanzenzellen, deren Stoffwechsel von den Nematoden so verändert wurde, dass sie gezielt der Ernährung der sich entwickelten Nematoden dienen. Endo-  
35 parasitäre Wurzel nematoden sind in ihrer Entwicklung von diesen Nährzellen absolut abhängig (zur Übersicht siehe Sijmons et al. (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32: 235-259). Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) verbleiben an der Parasitierungsstelle in der Wurzel (sessile Endoparasiten)  
40 wandeln die sie umgebenden Zellen durch Protoplastenfusion bei teilweiser Zellwandauflösung in Syncytien um. Diesen Nährzellen, die im Zentralzylinder der Wurzel gebildet werden, entnehmen die Nematoden ihre Nahrung und schwellen dabei stark an. Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) verbleiben ebenfalls an der  
45 einmal gewählten Parasitierungsstelle und veranlassen die Bildung von Nährzellen, welche aber, anders als bei den Zystenbildenden Nematoden aus mehreren, durch synchrone Kernteilungen ohne Zell-



wandbildung sich entwickelnden vielkernigen Riesenzellen bestehen (Fenoll and Del Campo (1998) Physiol. Mol. Biol. Plants 4:9-18). Die Bildung der Nährzellensysteme wird durch die Signalmoleküle im Speichel der Nematoden induziert. Es ist bekannt, dass während dieser Differenzierungsprozesse eine Reihe von Pflanzengenen ihr Expressionsprofil stark verändern. In der Literatur sind Promotoren beschrieben, die speziell in Nährzellsystem (Syncytien) induziert werden. Beispielfhaft seien zu nennen der  $\Delta 0.3$  TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223, der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Ecobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449), sowie Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832).

WO 94/10320 beschreibt DNA Konstrukte zur Expression von Genen, die als Inhibitoren endogener Pflanzengene wirken (z.B. ATP Synthase, Cytochrom C, Pyruvatkinase), unter der Kontrolle von Nematoden-induzierter Promotoren in den Syncytien.

Trotz einiger Fortschritte in manchen Bereichen der Pflanzenbiotechnologie, sind die Erfolge beim Erzielen einer Pathogenresistenz in Pflanzen sehr begrenzt und bislang nur gegen Viren hinreichend belegt. Insbesondere Ernteverluste infolge von Pilz- und Nematodenbefall stellen ein ernstzunehmendes Problem dar und erfordern nach wie vor den intensiven Einsatz von Fungiziden und Nematoziden. Dennoch sind die damit zusammenhängenden Probleme nur unzureichend in den Griff zu bekommen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrums von Pathogenen, bevorzugt von Pilzen und Nematoden, in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und

b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle pflanzlichen Organismen angewendet werden, die Saccharose produzieren. Dazu zählen alle höheren Pflanzen. Es wurde überraschender Weise beobachtet, dass auf Kartoffelscheiben transgener Kartoffelpflanzen, in deren Knollen aufgrund transgener Expression einer
- 10 Saccharoseisomerase Saccharose in Palatinose umgewandelt wird, das Wachstum des Pilzes *Alternaria* signifikant gehemmt ist.

Ferner kann beobachtet werden, dass die transgene Expression der Saccharoseisomerase auch eine Resistenz gegen Nematoden bewirkt.

- 15 Insbesondere eine durch endoparasitären Wurzelnematoden hervorgerufene Syncytien-spezifische Expression der Saccharoseisomerase-sequenz bewirkt eine deutliche Reduktion des Nematodenbefalls.

Da zahlreiche Pathogene, insbesondere Pilze und Nematoden, Palatinose nicht verstoffwechseln können, ist eine Überwindung der Resistenz durch einfache Mutation in den Pathogenen kaum möglich, da hierfür die Gewinnung einer neuen Enzymaktivität erforderlich wäre.

- 25 "Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität" meint im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Protein, das als "wesentliche Eigenschaft" die Isomerisierung von Saccharose zu anderen Disacchariden katalysiert, wobei die  $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zwischen Glukose und Fruktose in der Saccharose in eine andere
- 30 glykosidische Bindung zwischen zwei Monosaccharideinheiten überführt wird, insbesondere in eine  $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung und/oder einer  $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung.

- Eine Saccharoseisomerase-Aktivität kann indirekt über die
- 35 Analyse der resultierenden Kohlenhydrate (z.B. Palatinosegehalt) in der dem Fachmann geläufigen Weise beispielsweise durch Analyse ethanolischer Extrakte entsprechenden biologischen Materials (z.B. Material einer transgenen Pflanze oder eines Mikroorganismus) gemessen werden. Besagte Extrakte können z.B.
- 40 durch HPLC analysiert und die Zucker anhand der entsprechenden Standards identifiziert werden. Ein Verfahren zur Analyse ist z.B. in WO 01/59136 beschrieben. So werden zum Nachweis von Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzenextrakten Blattscheiben mit einem Durchmesser von ca. 0,8 cm für 2 h bei 70°C mit  $\pm 100 \mu\text{l}$
- 45 80 % Ethanol und 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) extrahiert. Für die Analyse eines Aliquots dieser Extrakte kann ein HPLC-System z.B. der Firma Dionex verwendet werden, welches mit einer PA-1 (4 x

250 mm)-Säule und einen gepulsten elektrochemischen Detektor ausgestattet werden kann. Vor der Injektion können die Proben für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert werden. Die Zucker können anschließend mit einem 10 minütigen Gradienten von 0 bis 1 M Natriumacetat nach 4 Minuten bei 150 mM NaOH und einer Durchflussrate von 1 ml/min eluiert werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Zucker können die entsprechenden Standards der Firma Sigma verwendet werden.

- 10 Besonders bevorzugt wird unter einem Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität ein Protein verstanden, das als wesentliche Eigenschaft zur Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose und/oder Trehalulose befähigt ist. Dabei beträgt der Anteil von Palatinose und Trehalulose an den gesamten Disacchariden, die
- 15 durch Isomerisierung von Saccharose gebildet werden mindestens 2 %, bevorzugt mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 %.

- Die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder
- 20 nach herkömmlichen Verfahren synthetisiert werden.

Beispiele für Organismen, deren Zellen Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität sowie die dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, sind insbesondere Mikroorganismen der

25 Gattungen Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium, Klebsiella und Enterobacter. Insbesondere sind hier folgende Beispiele für solche Mikroorganismen zu nennen:

- 30 Protaminobacter rubrum (CBS 547, 77), Erwinia rhapontici (NCPB 1578), Serratia plymuthica (ATCC 15928), Serratia marcescens (NCIB 8285), Leuconostoc mesenteroides NRRL B-52 If (ATCC 1083 0a). Pseudomonas mesoacidophila MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619), Agrobacterium radiobacter MX-232 (FERM 12397 bzw. FERM BP
- 35 3620), Klebsiella subspezies und Enterobacter spezie.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharoseisomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine

40 mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- i) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein gemäß  
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 und

- ii) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 und
- 5 iii) Nukleinsäuresequenzen kodierend für funktionell äquivalente Fragmente zu einem Protein gemäß i) und ii).

Weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, sind im Stand der Technik bekannt und stehen dem Fachmann somit für den Transfer auf Pflanzenzellen zur Verfügung. So sind z.B. Sequenzen aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter species* SZ 62 und *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 in WO 95/20047 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich  
15 Bezug genommen, sowohl hinsichtlich der offenbarten Sequenzen selbst, als auch im Hinblick auf die Auffindung und Charakterisierung dieser und weiterer Saccharoseisomerase kodierender Sequenzen aus anderen Quellen.

- 20 Weitere für Saccharoseisomerasen kodierende DNA-Sequenzen kann der Fachmann u.a. den Gendatenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Durchmustern nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Saccharoseisomerase kodierende  
25 Nukleinsäuresequenzen aus anderen Organismen mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann z.B. geeignete Hybridisierungs-sonden von den bekannten Saccharoseisomerase-Sequenzen ableiten und für das Durchmustern  
30 von cDNA-und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, aus dem ein neues Saccharoseisomerase-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen (siehe z.B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning:  
35 A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Ebenso ist der Fachmann in der Lage, anhand bekannter Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen geeignete - gegebenenfalls degenerierte - Oligonukleotide als Primer für Klonierungen neuer Gene mittels PCR zu synthetisieren  
40 und erfolgreich einzusetzen.

Proteine mit Saccharoseisomerase Aktivität sowie die dafür kodierenden Nukleinsäuresequenzen kann der Fachmann in der ihm geläufigen Weise unschwer aus solchen Organismen isolieren, in  
45 denen solche Aktivitäten detektiert wurden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (z.B. DE 44 14 185). So kann z.B. durch partiellen Verdau von genomischer DNA eines solchen Organismus

(bevorzugt eines Mikroorganismus) und Einbringen der erhaltenen Fragmente in geeignete E.coli-Vektoren und Transformation eine Genbank gewonnen werden, deren Klone genomische Abschnitte zwischen 2 und 15 kb des Spenderorganismus enthalten. Aus E.coli-  
5 Zellen, die diese Plasmide tragen, werden durch Plattierung auf McConkey-Palatinosemedium solche ausgewählt, die eine Rotfärbung der Kolonie aufweisen. Die in diesen Zellen enthaltene Plasmid-DNA wird in eine E.coli-Mutante überführt, die auf Galactose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann (z.B. ED 8654, Sambrook  
10 et al., supra, Seiten A9-A13). Diese transformierte Zelllinie ist zur Identifikation von Palatinoseproduzenten in der wie oben beschrieben hergestellten Genbank aus DNA des Spenderorganismus in der Lage. Zur Identifikation der gesuchten Palatinose-bildenden Klone werden die Zellen der Genbank  
15 auf Minimal-Salzmedien mit Galactose und Saccharose vereinzelt und angezogen. Nach Replika-Stempeln der Kolonien auf Platten mit dem gleichen Medium werden die Zellen durch Bedampfung mit Toluol abgetötet. Anschließend werden Zellen des Screeningstamms als Rasen in Minimalsalz-Weichagar ohne C-Quellenzusatz über  
20 die Kolonien der Genbank ausgebracht und bebrütet. Es entsteht signifikantes Wachstum der Zellen des Screeningstamms nur am Ort von Zellen der Genbank, die Palatinose produziert haben. Bei Prüfung der Zellen der Replikakontrolle ergibt sich der Gehalt an Isomerase. Diese so identifizierten E.coli-Klone sind  
25 auf Palatinose als einziger C-Quelle im Medium nicht wachstumsfähig, zeigen im Test der ganzen Zellen oder in Zellextrakten keine Fähigkeit zur Spaltung von Saccharose, bilden aber unter diesen Bedingungen und ohne Zusatz von Saccharose zum Medium bei der Anzucht Palatinose.  
30

Alternativ können Isomerase-Klone auch unter Verwendung eines PCR-Fragments identifiziert werden. Verwendet man Plasmid-DNA den so identifizierten E.coli-Klonen als Sonden zur Hybridisierung an Filtern mit immobilisierter DNA aus dem  
35 Spenderorganismus, lassen sich die Genbereiche, die Isomerase-gene tragen, nachweisen und gezielt verfügbar machen.

Funktionelle Äquivalente der im Rahmen dieser Erfindung offenbarten Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität umfassen  
40 bevorzugt solche aus anderen Organismen, beispielsweise aus Mikroorganismen, deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium, Klebsiella und Enterobacter. Diese können z.B.  
45 durch Datenbanksuche in Sequenzdatenbanken wie GenBank oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Banken - z.B. unter Verwendung der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder eines Teils derselben als

Suchsequenz bzw. Sonde - aufgefunden werden. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

- 5 So kann der Fachmann, falls erwünscht, zusätzlich mittels Routinetechniken, verschiedenartige Mutationen in die die Saccharoseisomerase kodierende DNA-Sequenz einführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. So ist es z.B. möglich, gezielt
- 10 Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind in der Literatur beschrieben und dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Braun et al. (1992) EMBO J 11:3219-3227; Wolter F et al. (1988) Proc Natl Acad
- 15 Sci USA 85:846-850; Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1:95-106).

- Weiterhin ist auch die Einführung von Punktmutationen an Positionen denkbar, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielsweise auf die Enzymaktivität
- 20 oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr den normalerweise in der Zelle herrschenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen. Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat-
- 25 oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-, Temperatur- und/oder pH-Profil aufweisen.

- Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a.
- 30 die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codonpräferenz ("codon usage") der Zielpflanze, also der aufgrund der Expression der Saccharoseisomerase-Nukleinsäuresequenz pathogenresistenten Pflanze bzw. Pflanzenzelle, anzupassen und die Expression dadurch zu optimieren.

- 35 Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-
- 40 Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al. (1989), vide supra) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente - wo erforderlich - Adapter oder Linker angefügt
- 45 werden. Ferner können mittels enzymatischer und anderer Manipulationen passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung gestellt oder überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen

## 10

entfernt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse und  
5 weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt  
10 mindestens 90 % zu einer der Polypeptidsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 60 Aminosäuren besonders bevorzugt mindestens 90 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge eines  
15 der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver-  
20 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

25 Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

- Average Mismatch:-2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von  
30 mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

35 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu einer der Nukleinsäuresequenzen mit der SEQ ID NO: 1, 3,  
40 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 haben. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 100 Basen, bevorzugt mindestens 200 Basen besonders bevorzugt mindestens 300 Basen, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.

45

Length Weight: 3

Average Mismatch: 0

20 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vor-

25 genannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Saacharoseisomerase aufweisen.

30 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem  
bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular  
Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor  
Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Pro-  
35 6.3.1-6.3.6.) beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und  
40 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben  
45 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.



Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung 5 und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- 10 a) 4X SSC bei 65°C,
- b) 6X SSC bei 45°C,
- c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
- f) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C,
- 15 h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

(2) Waschschriffe können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
- b) 0,1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
- 25 d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
- f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäuresesequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharoseisomerase-Aktivität, Nukleinsäuresesequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodierend, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- 35 a) Nukleinsäuresesequenzen kodierend eine Aminosäuresesequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22, und
- b) Nukleinsäuresesequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von mindestens 40 % zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2,
- 40 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 aufweisen, und
- c) Nukleinsäuresesequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21, und
- 45 d) Nukleinsäuresesequenzen, die zu einer Nukleinsäuresesequenz von c) degeneriert ist, und

- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40 % zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 aufweisen, und
- 5 f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 hybridisieren,

sowie funktionell äquivalenten Fragmenten der vorgenannten.

10

Funktionell äquivalente Fragmente meint in Bezug auf ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität bzw. eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine solche, all solche Polypeptide bzw. für diese kodierenden Nukleinsäuresequenz, die gegenüber ihrer Ausgangs-

- 15 sequenz eine Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende und/oder eine oder mehrere Deletionen aufweisen, aber nach wie vor über eine Saccharoseisomerase-Aktivität verfügen, bzw. für ein Protein mit derselben kodieren. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende
- 20 Deletion vom 5'- oder vom 3'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz die Synthese entsprechend verkürzter Proteine erreicht werden kann.

- Wie oben erwähnt, können die kodierenden Sequenzen für Saccha-
- 25 roseisomerasen auch durch Signalsequenzen ergänzt sein, die für den Transport des Genprodukts, also vorliegend des Proteins mit Saccharoseisomerase-Aktivität, zu einem bestimmten Kompartiment sorgen.

- 30 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sorgen Signalsequenzen dafür, dass die Saccharoseisomerase in die Zellwand bzw. den Apoplasten der transformierten Pflanzenzellen transportiert wird, d.h. die transformierten Pflanzen exprimieren eine chimäre Saccharoseisomerase, die ein Signalpeptid für den Trans-
- 35 port in das Endoplasmatische Retikulum umfasst. Geeignete Signalsequenzen, die die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum gewährleisten, kann der Fachmann der einschlägigen Literatur entnehmen. Besonders geeignet ist z.B. die für das Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus Kartoffel kodierende
- 40 Sequenz (Keil et al. (1996) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Accession No. X04118). Andere geeignete Signalsequenzen sorgen z.B. für die Aufnahme der Saccharoseisomerase in die Vakuole. Hier ist als Beispiel das Signalpeptid des Patatin-Gens aus Kartoffel (Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1(1):95-106) zu
- 45 nennen.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung der Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

- 10 "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein oder mehrere Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheits-
- 20 symptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders
- 25 bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.

- "Auswahl" umfasst in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilz-
- 35 infektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

- 40 "Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Pilze, pilzähnliche Pathogene (wie beispielsweise Chromista; z.B. Oomyceten) sowie tierische Schädlinge wie beispielsweise Nematoden. Besonders bevorzugt sind Nematoden und Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Expression eines
- 45 Saccharoseisomerase-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene:

5

Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) umfassen biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze und stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15 Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
	Braunrost	Puccinia recondita
20	Gelbrost	P. striiformis
	Echter Mehltau	Erysiphe graminis
	Spelzenbräune	Septoria nodorum
	Blattdürre	Septoria tritici
25	Ährenfusariosen	Fusarium spp.
	Halmbruchkrankheit	Pseudocercospora herpotrichoides
	Flugbrand	Ustilago spp.
	Weizensteinbrand	Tilletia caries
	Schwarzbeinigkeit	Gaeumannomyces graminis
30	Anthracnose leaf blight	Colletotrichum graminicola (teleomorph: Glomerella graminicola)
	Anthracnose stalk rot	Politis); Glomerella tucumanensis (anamorph: Glomerella falcatum Went)
35	Aspergillus ear and kernel rot	Aspergillus flavus
	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris)
40	Black bundle disease	Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda
	Black kernel rot	Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
	Borde blanco	Marasmiellus sp.
45	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium

	Erkrankung	Pathogen
	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
5	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Coch- liobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (tele- omorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuber- culata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
10	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
	Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seed- ling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
20	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodia leaf macrospora

Tabelle 2: Falscher Mehltau (Oomyceten)

25

	Erkrankung	Pathogen
	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zeae
30	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
	Green ear downy mi- ldew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
35	Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
	Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
	Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
40	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
	Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
45	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)

Erkrankung	Pathogen
5 10 Ear rots, minor	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydis, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii
15 Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
Fusarium ear and stalk rot	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
20 Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
Fusarium stalk rot, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
25 Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
Gray ear rot	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
30 Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helmin- thosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
35 Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	Cladosporium cladosporioides = Hormo- dendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
Late wilt	Cephalosporium maydis

	Erkrankung	Pathogen
5	Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victorae = Helminthosporium victorae (teleomorph: Cochliobolus victorae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
10		
15		
20	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helmin- thosporium turcicum)
	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
25	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocyto- sporella zeae
	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
30	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenochaeta stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
35	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
40	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae

Erkrankung	Pathogen
5 10 Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
15 Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
Rust, common corn	Puccinia sorghi
Rust, southern corn	Puccinia polysora
Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae
20 Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
25 30 Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
35 Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Smut, common	Ustilago zeae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoida virens
Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
40 Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora



	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinatum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
15	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. mancharica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudo-peronospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gräsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschiimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

- mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Ucnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophthora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophthora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophthora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzelkanker an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).
- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmschürfwurmkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rhynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

## 22

*Fusarium oxysporum* (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. *hordei*) und Weizen (f.sp. *tritici*)), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria nodorum* und *Septoria tritici* (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

## 10 2. Tierische Schädlinge

Als tierische Schädlinge sind insbesondere Nematoden bevorzugt. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 3: Parasitäre Nematoden

	Schädigung	Pathogene Nematode
20	Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
	Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
25	Burrowing	<i>Radopholus similis</i>
	Haferzystenälchen ("Cyst")	<i>Heterodera avenae</i> , <i>H. zeae</i> , <i>Punctodera chaltoensis</i>
	Dagger	<i>Xiphinema</i> spp., <i>X. americanum</i> , <i>X. mediterraneum</i>
30	False root-knot	<i>Nacobbus dorsalis</i>
	Lance, Columbia	<i>Hoplolaimus columbus</i>
	Lance	<i>Hoplolaimus</i> spp., <i>H. galeatus</i>
35	Lesion	<i>Pratylenchus</i> spp., <i>P. brachyurus</i> , <i>P. crenatus</i> , <i>P. hexincisus</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. penetrans</i> , <i>P. scribneri</i> , <i>P. thornei</i> , <i>P. zeae</i>
	Needle	<i>Longidorus</i> spp., <i>L. breviannulatus</i>
	Ring	<i>Criconemella</i> spp., <i>C. ornata</i>
40	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	<i>Meloidogyne</i> spp., <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
	Spiral	<i>Helicotylenchus</i> spp.
	Sting	<i>Belonolaimus</i> spp., <i>B. longicaudatus</i>
45	Stubby-root	<i>Paratrichodorus</i> spp., <i>P. christiei</i> , <i>P. minor</i> , <i>Quinisulcius acutus</i> , <i>Trichodorus</i> spp.
	Stunt	<i>Tylenchorhynchus dubius</i>

## 23

Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Hafer-  
5 zystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zucker-  
10 rübe, Luzerne).

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Pilzpathogene erzielt:

- 15 1. Gerste: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (barley stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (Barley Powdery Mildew).
- 20 2. Sojabohne: *Phytophthora megasperma* fsp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*),  
25 *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, *Glomerella glycines*, *Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium solani*.
- 30 3. Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.
- 35 4. Alfalfa: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*,  
40 *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.
- 45 5. Weizen: *Urocystis agropyri*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Colletotrichum graminicola*,

- 5 Erysiphe graminis f.sp. tritici, Puccinia graminis f.sp. tritici, Puccinia recondita f.sp. tritici, Puccinia striiformis, Pyrenophora tritici-repentis, Septoria nodorum, Septoria tritici, Septoria avenae, Pseudocercospora herpotrichoides, Rhizoctonia solani, Rhizoctonia cerealis, Gaeumannomyces graminis var. tritici, Pythium aphanidermatum, Pythium arrhenomanes, Pythium ultimum, Bipolaris sorokiniana, Claviceps purpurea, Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia indica, Rhizoctonia solani, 10 Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola, Pythium aphanidermatum, Puccinia graminis f.sp. tritici (Wheat stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici (Wheat Powdery Mildew)
- 15 6. Sonnenblume: Plasmophora halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria helianthi, Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alternaria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macrophomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae, Rhizopus arrhizus, Rhizopus 20 stolonifer, Puccinia helianthi, Verticillium dahliae, Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo tragopogonis.
- 25 7. Mais: Fusarium moniliforme var. subglutinans, Fusarium moniliforme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum), Stenocarpella maydi (Diplodia maydis), Pythium irregulare, Pythium debaryanum, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis 0, T (Cochliobolus heterostrophus), 30 Helminthosporium carbonum I, II & III (Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum I, II & III, Helminthosporium pedicellatum, Physoderma maydis, Phyllosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi, Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macrophomina phaseolina, 35 Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae, Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inaequalis, Curvularia pallescens, Trichoderma viride, Claviceps sorghi, Cornstunt spiroplasma, Diplodia macrospora, Sclerophthora macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinesis, Peronosclerospora maydis, Peronosclerospora 40 sacchari, Spacelotheca reiliana, Physopella zeae, Cephalosporium maydis, Cephalosporium acremonium.
- 45 8. Sorghum: Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora sorghi, Ascochyta sorghina, Puccinia purpurea, Macrophomina phaseolina, Perconia circinata, Fusarium moniliforme, Alter-

## 25

naria alternate, Bipolaris sorghicola, Helminthosporium sorghicola, Curvularia lunata, Phoma insidiosa, Ramulispora sorghi, Ramulispora sorghicola, Phyllachara sacchari, Sporisorium reilianum (Sphacelotheca reiliana), Sphacelotheca cruenta, Sporisorium sorghi, Claviceps sorghi, Rhizoctonia solani, Acremonium strictum, Sclerophthona macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis, Sclerospora graminicola, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Nematodenpathogene erzielt:

15	Zucker- rübe	Zuckerrübenzystenälchen (Sugar beet cyst nematode)	Heterodera schachtii
	Kartoffel	Columbia Wurzelgal- lenälchen (Columbia Root- knot Nematode)	Meloidogyne chitwoodi
20		Golden Nematode	Globodera rostochiensis
		Nördliches Wurzelgal- lenälchen (Northern Root Knot Nema- tode)	Meloidogyne hapla
		Potato Rot Nematode	Ditylenchus destructor
25	Sojabohne	Sojabohnezystenälchen (Soybean cyst nematode; SCN)	Heterodera glycines
	Mais	Maiszystenälchen (Corn Cyst Nematode)	Heterodera zeae
30		Wurzelgallenälchen (Root-Knot Nematodes)	Meloidogyne species: Meloidogyne arenaria Meloidogyne graminicola Meloidogyne chitwoodi Meloidogyne hapla Meloidogyne incognita Meloidogyne javanica
35			

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits

des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und  
5 Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen  
10 Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

15 "Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährigen, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium,  
20 Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium,  
25 Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae,  
30 Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniaceae, Theaceae, Umbelliferae.

35 Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr  
40 sowie alle Arten von Gräsern.

## 27

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- 5
  - Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- 10
  - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- 15
  - Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,
- 20
  - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
  - Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr
- 25
  - Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,
- 30
  - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate), die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine), und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Paprika) sowie Tabak und andere mehr,
- 35
  - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakaostrauch) und andere mehr,
- 40
  - Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- 45
  - Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karrotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selderie)) und andere mehr,



sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

- 5 Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Krotön, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.
- 10
- 15
- 20 Am meisten bevorzugt sind landwirtschaftliche Nutzpflanzen, die von Natur aus einen hohen Anteil an Saccharose aufweisen oder deren Wurzeln, Knollen oder Speicherwurzeln wirtschaftlich verwertet werden, wie z.B. Kartoffel, Rübe oder Zuckerrübe. Ebenfalls bevorzugt sind Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr,
- 25 Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja sowie Getreidearten wie Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais. Am meisten bevorzugt sind Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe und Zuckerrohr.

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen Expressionskonstrukte
- 30 zur Expression von Proteinen mit Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzen zum Einsatz. Derartige Expressionskassetten sind beispielsweise in WO 01/59136 und WO 01/59135 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.
- 35 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder eines funktionellen Äquivalentes desselben oder eines funktionell äquivalenten Teils der vorgenannten) bevorzugt in funktioneller Verknüpfung
- 40 mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine transgene Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben gewährleistet.
- 45 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel der Sequenz

gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen, einer att-Sequenz für Rekombinasen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das transgene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einem Expressionskonstrukt sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für das Proteins mit Saccharoisomerase-Aktivität (z.B. kodiert durch SEQ ID NO: 2 oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Teil der vorgenannten) - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - so hinter einen endogenen pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die transgene Expression der besagten Nukleinsäuresequenz gewährleistet.

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass  
5 die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe oder Organ, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In Bezug auf die zu transformierende Pflanze kann  
10 der Promotor homolog oder heterolog sein. Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

15 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor  
20 oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986)  
25 Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus  
30 Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der  
35 Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter-einheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere  
40 bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus A. thaliana (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

## b) Gewebespezifische Promotoren.

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Blätter, Stengel, Wurzeln oder Samen.

5

Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53; z.B. aus Phaseolus vulgaris; van der Geest et al. (1996) Plant Mol Biol 32:579-588), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-467; Phillips et al. (1997) EMBO J 16:4489-4496), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), der Hordein-Promotor (Brandt et al. (1985) Carlsberg Res. Commun. 50:333-345) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Bäumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-239; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980).

25

30

35

40

Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase), der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, der Promotor der Stärkesynthese oder anderer Stärke bildender/modifizierender Enzyme wie z.B. Promotoren von Genen die für Verzweigungsenzyme kodieren (WO 92/14827, WO 92/11375). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.

45

- Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
- Besonders bevorzugt ist dabei der B33-Promotor des Klasse I Patatin-Gens aus Solanum tuberosum (Rocha-Sosa et al.

(1989) EMBO J 8:23-29). Der Promotor des Klasse I Patatin-Gens ist in Knollen ca. 100 bis 1000 mal aktiver als in Blättern (Rocha-Sosa et al., vide supra). Weitere Gene mit knollenspezifischer oder zumindest in Knollen verstärkter Expression sind bekannt (z.B. der Promotor der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase-Gene; Müller et al. (1990) Mol Gen Genet 224:136-146).

- Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase; US 4,962,028) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol Biol 36:101-112).

c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die transgenen Expressionskonstrukte können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

d) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Frucht-reifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Frucht-reifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

## e) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPDK Promotor.

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen,  $\beta$ -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498; EP-A 375 091), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Besonders bevorzugt sind Promotoren, die speziell in Nährzellsystemen (Syncytien) nach Nematodenbefall induziert werden. Beispielhaft seien zu nennen

- i) der  $\Delta$ 0.3 TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) Science 263: 221-223), insbesondere der durch SEQ ID NO: 24 beschriebene Promotor,
- ii) der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449), insbesondere der durch SEQ ID NO: 23 beschriebene Promotor, sowie

- iii) Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832), insbesondere die durch SEQ ID NO: 32, 33 oder 34 beschriebenen Promotoren.

- 5 Besonders bevorzugt sind pathogen- oder stress-induzierbare, sowie Samen-, Knolle-, Wurzel-, Blatt- und/oder Stengel-spezifische, insbesondere epidermis-spezifische Promotoren, wobei pathogen-induzierbare und epidermis-spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.
- 10 Ein weiterer - besonders bevorzugter - Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, in denen eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität in funktioneller Verknüpfung mit einem stress-, pathogen-, oder
- 15 verwundungs-induzierbaren Promotor steht. Stress-, pathogen oder verwundungs-induzierbare Promotoren meint allgemein all solche Promotoren, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden können. Abiotischer Stress meint dabei Stimuli wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Frost, Feuchte, Salz, UV-Licht
- 20 usw. Biotischer Stress meint dabei den Befall durch ein Pathogen, wobei der Begriff "Pathogen" all die oben genannten Pathogene umfasst. Dabei hat der Stimulus bevorzugt eine Stärke, die zu einem Ertragsrückgang von mindestens 5 % im Vergleich zu durchschnittlichen Ertragswerten führt. Induzierbar meint dabei eine
- 25 Erhöhung der Transkriptionsaktivität um mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 100 %, besonders bevorzugt mindestens 500 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 %, am meisten bevorzugt mindestens 5000 % im Vergleich zu der Expressionsaktivität einer nicht-stimulierten Pflanze. Stress- oder pathogen-induzierbare
- 30 Promotoren umfassen beispielhaft, jedoch nicht einschränkend den pathogen-induzierbaren Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), den hitzeinduzierbaren hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), den kälteinduzierbaren  $\alpha$ -Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), den licht-
- 35 induzierbaren PPK Promotor oder den verwundungs-induzierbaren pinII-Promoter (EP-A 0 375 091). Bevorzugt sind insbesondere pathogen-induzierbare Promotoren wie z.B. die Promotoren der PR-Proteine, SAR-Proteine,  $\beta$ -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254;
- 40 Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98;
- 45 Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968). Umfasst

sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1- und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen. Verwundungs-induzierbare Promotoren sind bei Befall durch Fraßpathogene vorteilhaft einzusetzen.

Der Durchschnittsfachmann kann darüber hinaus ohne weiteres zusätzliche Beispiele für Gene mit stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierten Expressionsmustern der Literatur entnehmen. Ferner ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien entsprechende regulatorische Nukleinsäureelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten Schritt eine differentielle Expressionsbibliothek von beispielsweise pathogen-infizierten/befallenen und "normalem" Gewebe angelegt. Anschließend werden mit Hilfe der so identifizierten pathogen-induzierten cDNAs Promotoren isoliert, die über pathogen-induzierbare regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierter Promotoren zur Verfügung.

Besonders bevorzugt sind gewebespezifische Promotoren, insbesondere samenspezifische, knollenspezifische, fruchtspezifische und blattspezifische Promotoren sowie pathogen-induzierte Promotoren. Ganz besonders bevorzugt sind pathogeninduzierte Promotoren, insbesondere Nematoden-induzierte Promotoren.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel E.coli Bakterien ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den Expressionskonstrukten oder Expressionsvektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit



zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion eines Expressionskonstruktes haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen  
5 oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die Expressionskonstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzen-spezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls  
10 weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressions-  
15 teuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasser-stress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH (1991) J Biol Chem  
20 266(26):17131- 17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von  
25 Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde  
30 gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebes-  
35 pezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene  
40 Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer  
45 oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens* umfassen. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine Saccharoseisomerase kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden.

Ein transgenes Expressionskonstrukt und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide z.B. Metabolismusinhibitoren (wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika (wie z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin) oder Herbizide (wie Glyphosat oder Phosphinotricin) verleihen.

Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylhurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (spt) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (nptII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticin (G418) verleiht, das

Hygromycinphosphotransferase (hpt) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (als), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

- 5
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressions-  
10 ortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al.(1995) Plant Journal 8(5):777-784), Chloramphenicoltransferase,  
15 Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268),  $\beta$ -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).
- 20
- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli, gewährleisten. Beispielfhaft als ORI ("origin of DNA replication") seien  
25 genannt der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- d) Elemente, die für eine Agrobakterium-vermittelte Pflanzen-  
30 transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen  
35 eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von  
40 untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

Die Einführung eines erfindungsgemäßen Expressionskonstruktes in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen  
45 desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressions-

konstrukte enthalten sind. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Das transgene Expressionskonstrukt kann in den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle oder  
5 eine Rekombinase att-Sequenz eingeführt werden. Der entstandene transgene Expressionsvektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit den dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können  
10 dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration des transgenen Expressionskonstruktes in das pflanzliche Genom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer  
15 transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung  
20 (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch  
25 Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen  
30 Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhaus et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature  
35 327:70-73; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.)  
40 Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe  
oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation  
45 genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglycol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte

"particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

- 5 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind bei-  
10 spielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

- Werden *Agrobakterien* verwendet, so ist das transgene Expressionskonstrukt in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in  
15 einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit dem einzuführenden  
20 transgenen Expressionskonstrukt verbunden.

- Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen für die  
25 Selektion transformierter Pflanzen (z.B. das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht) und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Außerhalb der T-DNA-Begrenzungssequenz enthalten sie zudem noch einen Selektionsmarker, der eine Selektion trans-  
30 formierter *E.coli* und/oder *Agrobakteria* ermöglicht (z.B. das nptIII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht). Entsprechende Vektoren können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187).

- 35 Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes *Agrobacterium* kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Ver-  
40 wendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommer-  
45 ziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

## 41

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen werden keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache

5 Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es vorteilhaft, wenn sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

- 10 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen
- 15 Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen
- 20 untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht,
- 25 oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr
- 30 Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic

- 35 Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225. Vorzugsweise wird das Expressionskonstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren,
- 40 beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann be-

- 45 kannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise

induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen,  
5 Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11:567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

10

"Transgen" meint alle solche Konstruktionen und Verfahren, in denen sich entweder

- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit  
15 Saccharoseisomerase-Aktivität, oder
- b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- 20 c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei  
25 die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek.

30

35

40

45

## Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 5
2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 10
3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*  
*rhapontici* (N-terminales Fragment)
- 15
4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*  
*rhapontici* (N-terminales Fragment)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Erwinia rhapontici*
- 20
6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Erwinia rhapontici*
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
- 25
8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
- 30
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 35
11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Serratia plymuthica*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-  
isomerase aus *Serratia plymuthica*
- 40
13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für Fusions-  
protein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*  
*rhapontici* (*palI*) und Signalpeptidesequenz des  
Proteinase Inhibitor II Gens
- 45



14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici* (palI) und Signalpeptidesequenz des Proteinase Inhibitor II Gens
- 5
15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz (vollständige cDNA mit untranslatierter Region) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 10
16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 15
17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz (offenes Leseraster) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 20
18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 25
19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)
- 30
20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)
- 35
21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)
- 40
22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)
- 45
23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicum esculatum*)
24. SEQ ID NO: 24 Nukleinsäuresequenz kodierend für  $\Delta$ 0.3TobRB7 Promotorsequenz (Region: -298 bis +76) aus *Nicotiana tabacum*

45

25. SEQ ID NO: 25 Oligonukleotidprimer FB83  
5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3'
26. SEQ ID NO: 26 Oligonukleotidprimer FB84  
5'-GTCGACGTCTTGCCAAAACCTT-3'
27. SEQ ID NO: 27 Oligonukleotidprimer FB 97  
5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3'
28. SEQ ID NO: 28 Oligonukleotidprimer Lem1  
5'-atcGAATTCATAATTTAACCATCTAGAG-3'
29. SEQ ID NO: 29 Oligonukleotidprimer Lem2  
5'-atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG-3'
30. SEQ ID NO: 30 Oligonukleotidprimer Tob1  
5'-GGAATTCAGCTTATCTAAACAAAGTTTAAATTC-3'
31. SEQ ID NO: 31 Oligonukleotidprimer Tob2  
5'-GGGTACCAGTTCTCACTAGAAAATGCCCC-3'
32. SEQ ID NO: 32 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense  
Promotor aus Wheat Dwarf Virus (GenBank Acc.-  
No.: AX006849; Sequenz 1 aus WO 00/01832)
33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense  
Promotor aus Maize Streak Virus (GenBank Acc.-  
No.: AX006850; Sequenz 2 aus WO 00/01832)
34. SEQ ID NO: 34 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense  
Promotor aus Pepper huasteco Virus (GenBank  
Acc.-No.: AX006851; Sequenz 3 aus WO 00/01832)

## Abbildungen

1. Fig. 1: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:  
5 35S: 35S Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) Promotor  
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens  
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*  
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens  
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen  
10 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
2. Fig 2: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pB33-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:  
15 B33: Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33  
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens  
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*  
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens  
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen  
20 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
3. Fig. 3: Westernblot-Analyse von palI exprimierenden Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien. Pro Spur wurden 20 µg lösliches Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen, getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Filter wurden anschließend mit einem polyklonalen PalI Antikörper hybridisiert. Verglichen wurde die Expression in Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen (wt) mit der in den Kartoffellinien 5, 12, 26 und 33.  
25
- 30 4. Fig. 4: HPLC-Analyse der löslichen Kohlenhydrate in Saccharoseisomerase exprimierenden Pflanzen.  
A: Zuckerstandards.  
B: Extrakt einer transgenen Knolle.  
C: Extrakt einer Wildtypknolle.  
35
5. Fig. 5: Gehalt an Palatinose, Saccharose, Glucose und Stärke in Wildtyp-Kartoffelknollen (wt) und Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien (3 bis 37), die das chimäre palI Gen in der Zellwand exprimieren. Die Werte des Wildtyps (wt; gestreifte Säulen) und der transgenen Kartoffelknollen (3 bis 37; schwarze Säulen) entsprechen den Mittelwerten von vier Messungen ± Standardabweichung. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine transgene jedoch palI nicht-exprimierende Linie (Control) analysiert.  
40  
45

6. Fig.6: Infektion von Kartoffelknollen mit *Alternaria solani*. Kartoffelscheiben von Wildtyp-Knollen und Knollen der palI exprimierenden transgene Linien 5 und 33 zum Zeitpunkt 14 Tage nach Infektion mit *Alternaria solani*.
- 5 A: Kontrolle mit Kartoffelscheiben von Wildtyp (wt)- und transgenen Knollen (Linien 5 und 33) nach 14-tägiger Inkubation ohne vorherige *Alternaria* Infektion.
- B: Wildtypknollen; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
- C: Transgene Linie-5; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
- 10 D: Transgene Linie-33; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
7. Fig. 7: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pLemmi9-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:  
Lemmi9: Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*)
- 15 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens  
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*  
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens  
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen  
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
- 20 8. Fig 8: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pΔ0.3TobRB7-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:  
Δ0.3TobRB7: Δ0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*  
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
- 25 palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*  
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens  
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen  
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

### 30 Beispiele

#### Allgemeine Methoden:

- Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise,
- 35 in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte - wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren
- 40 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA - werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.
- 45 Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Hofgen und Willmitzer ((1988) Nucl. Acids Res. 16:9877) ausgeführt. Die Anzucht der *Agrobacterien* erfolgte

in YEB Medium (Vervliet et al. (1975) Gen Virol 26:33). Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: PCR-Amplifikation eines Subfragments der Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici*

- 10 Die Klonierung eines Subfragments der Saccharoseisomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische DNA aus *E. rhapontici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nach-
- 15 folgenden spezifischen Primer, die von einer Saccharoseisomerase-Sequenz des Standes der Technik abgeleitet wurden:

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

- 20 FB84 5'-GTCGACGTCTTGCCAAAACCTT-3' (SEQ ID NO: 26)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB84 die Basen 1289 bis 1306 der kodierenden Region des Saccharoseisomerase-Gens von *E. rhapontici*.

25

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

- chromosomale Bakterien DNA (1 µg)
- Primer FB 83 und FB 84 (jeweils 250 ng),
- 30 - Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

- Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min
- 35 auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt
- 40 (Invitrogen) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert.

- Das amplifizierte Subfragment kann auch als Hybridisierungssonde für die Isolierung weiterer Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen
- 45 aus anderen Organismen oder als Sonde bei der Analyse transgener Zellen und Pflanzen eingesetzt werden.

Beispiel 2: PCR-Amplifikation einer Saccharoseisomerase aus  
*Erwinia rhapontici*

Unter Verwendung des in Beispiel 1 amplifizierten Fragmentes  
5 wurde eine genomische Bank von *Erwinia rhapontici* nach Standard-  
methoden durchmustert. Anschließende Sequenzanalysen erlaubten  
die Bestimmung des offenen Leserahmens der Saccharoseisomerase.  
Von dieser Sequenz wurden die Oligonukleotidprimer FB83 und FB97  
abgeleitet.

10

Die Klonierung des vollständigen offenen Leserasters der  
Saccharose-Isomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion  
(Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente  
genomische DNA aus *E. rhapontici* (DSM 4484), die nach Standard-  
15 protokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Ver-  
wendung der nachfolgenden spezifischen Primer

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB97 5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3' (SEQ ID NO: 27)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB97 die  
Basen 1786 bis 1803 der kodierenden Region des Saccharose-  
isomerase-Gens. Zur Klonierung der amplifizierten DNA in  
25 Expressionsvektoren tragen die Primer zusätzlich folgende  
Restriktionsschnittstellen: Primer FB 83, BamHI und Primer FB 97,  
SalI.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomale Bakterien-DNA (1 µg),
- Primer FB83 und FB97 jeweils 250 ng,
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 35 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min  
auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden  
in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem  
40 Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung  
der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C  
(2 Minuten). Das amplifizierte Saccharoseisomerase-Fragment  
wurde in den Vektor pCR-Blunt (Invitrogen) kloniert, wodurch  
das Plasmid pCR-SucIso2 (ohne Translationsstart) erhalten wurde.  
45 Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse  
verifiziert. Das PCR-Fragment beinhaltet somit die Sequenz einer

Saccharoseisomerase aus *E. rhapontici*, die sich von Nukleotid 109-1803 des Saccharoseisomerase-Gens erstreckt.

### Beispiel 3: Herstellung von Plasmid p35S-cwIso

5

Eine DNA Sequenz, die für eine Saccharose-Isomerase kodiert, wurde aus dem Plasmid pCR-SucIso2 isoliert und mit dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzenzellen vermittelt sowie  
10 einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens.

Vor die kodierende Sequenz des Saccharoseisomerase-Gens wurde  
15 außerdem ein für die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Gens (Proteinase-Inhibitor II-Gen aus Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.-No.: X04118) fusioniert. Dazu wurde  
20 das Saccharoseisomerase-Fragment aus dem Konstrukt pCR-SucIso2 über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI herausgeschnitten und in einen BamHI/SalI-geöffneten pMA-Vektor ligiert. Der Vektor pMA stellt eine modifizierte Form des Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) dar. Welche  
25 den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzen vermittelt, ein Signalpeptid des Proteinase-Inhibitors II aus Kartoffel, welches die Zielsteuerung des Fusionsproteins in die Zellwand vermittelt, sowie ein pflanzliches Terminationssignal enthält. Das pflanzliche  
30 Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens. Zwischen der Teilsequenz des Proteinase-Inhibitors und dem Terminationssignal befinden sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, XbaI, SalI, PstI und SphI (in dieser Reihenfolge), welche die Insertion entsprechender DNA-Fragmente ermöglichen, so dass ein Fusion-  
35 sprotein zwischen dem Proteinase-Inhibitor Signalpeptid und dem eingefügten Protein entsteht, welches dann in die Zellwand von transgenen Pflanzenzellen befördert wird, die dieses Protein exprimieren. Die Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso besteht somit aus den Fragmenten A,B und C (Fig. 1):

40

A) Fragment A beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt (Franck (1980) Cell 21:285).

45

- 5 B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines  
Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al.,  
supra), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA  
TTG GG an das Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*,  
welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind.  
Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das Endo-  
plasmatische Retikulum (ER) notwendige Signalpeptid eines  
pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase  
Sequenz fusioniert.
- 10 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-  
Synthase Gens (Dhaese et al.(1983) EMBO J. 2:419-426. GenBank  
Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).
- 15 In p35S-cwIso (35S = 35S-Promotor, cw = Zellwand, Iso =  
Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharose-  
isomerase aus *E. rhapontici* unter konstitutiver Kontrolle,  
das Genprodukt wird in das ER aufgenommen und anschließend  
sekretiert.
- 20 Beispiel 4: Herstellung von Plasmid pB33-cwIso
- Das Plasmid pB33-cwIso wurde unter Verwendung des binären  
Plasmids p35S-cwIso hergestellt. Dabei wurde der 35S-Promoter  
25 gegen den Promotor des Klasse I Patatin-Gens (Rocha-Sosa et al  
(1989) EMBO J 8:23-29) ausgetauscht. Die Expressionskassette  
dieses Plasmids pB33-cwIso besteht somit aus den drei Fragmenten  
A, B und C (siehe Fig. 2):
- 30 A) Fragment A beinhaltet die Region -1512 bis +14 relativ  
zur Transkriptionsinitiationsstelle des Klasse I Patatin-  
Gens. Die Promotorregion wurde als DraI-Fragment in den  
mit SstI geschnittenen Vektor pUC18, dessen Enden unter  
Einsatz der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und somit geglättet  
35 worden waren, ligiert. Anschließend wurde das Fragment  
mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 aus dem  
Vektor pUC18 wieder ausgeschnitten und in das Plasmid  
p35S-cwIso kloniert, aus dem vorher der 35S CaMV-Promotor  
nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und  
40 Asp718 deletiert worden war.
- B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines  
Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel, welche  
über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das  
45 Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die  
Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch  
wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges



Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

- C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426; GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

In pB33-cwIso (B33 = Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhapontici* unter gewebe-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

#### Beispiel 5: Kartoffeltransformation und Selektion transgener Pflanzen

20 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara) wurden in 10 ml MS-Medium mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 5-minütigem, leichtem Schütteln wurden die Petrischalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurde die Claforankonzentration im Medium halbiert. Eine weitere Woche Kultivierung erfolgte unter bekannten Bedingungen (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29).

30 Unter Verwendung des pB33-cwIso Plasmids wurden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation insgesamt 36 kanamycin-resistente Kartoffelpflanzen regeneriert. Die Knollen dieser Pflanzen wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das rekombinante PalI Protein (Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364) auf palI Expression untersucht. Bei 25 Linien konnte palI Expression im Westernblot nachgewiesen werden. Ein Westernblot von repräsentativen Linien ist in Fig. 3 dargestellt.

#### Beispiel 6: HPLC-Analyse der transgenen pB33-cwIso-Kartoffeln

Mit dem Ziel des Nachweises der in vivo Konversion von Saccharose in Palatinose wurden Knollenextrakte der transgenen Linien mittels HPLC hinsichtlich ihres Gehaltes an löslichen Kohlenhydraten untersucht. Die HPLC Analyse wurde nach der in Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Herstellung der Knollen Extrakte ist beschrieben

bei Sonnewald et al. (1992) Plant J 2:571-581. Die Resultate der HPLC Analyse sind in Fig. 4 dargestellt.

Wie die Chromatogramme zeigen, führt die Expression der  
5 Saccharoseisomerase in der Zellwand zu einer substantiellen  
Akkumulation von Palatinose in den Knollen der untersuchten  
pB33-cwIso-Linien. Der Wildtyp enthält keine Palatinose, wie  
ebenfalls aus den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist.  
Der Gehalt an löslichen Zuckern in transgenen Kartoffel-  
10 knollen, die das Konstrukt pB33-cwIso enthalten, ist in Fig. 5  
dargestellt. Der Gehalt an Palatinose in den Kartoffelknollen  
variiert zwischen den einzelnen transgenen Linien zwischen  
1,7  $\mu\text{mol/g}$  FW (FW: "fresh weight" = Frischgewicht) (Linie 14)  
und 16  $\mu\text{mol/g}$  FW (Linie 5).

15 Beispiel 7: Infektion von Karoffelscheiben mit *Alternaria solani*  
*Alternaria solani* (bereitgestellt von Dr. Jürgen Sigrist, Zentrum  
für Grüne Gentechnik, Neustadt an der Weinstraße) wurden auf  
20 PDA-Agar (Duchefa, Niederlande) für 14 Tage bei 16°C gehalten  
(PDA = Potato Dextrose Agar). Die Sporen wurden durch Abschaben  
in Wasser isoliert und die erhaltene Suspension durch Miracloth  
von festen Bestandteilen befreit. Die Sporenzahl wurde in einer  
Zählkammer (Thoma) bestimmt und auf 10000 Sporen/ml eingestellt.  
25 25  $\mu\text{l}$  (demnach 250 Sporen) wurden pro Kartoffelscheibe (1,5 cm  
Durchmesser) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die inokulier-  
ten Scheiben wurden anschließend bei 16°C inkubiert. Die Bonitur  
erfolgte optisch. Das Ergebnis nach 14-tägiger Inkubation ist in  
Fig. 6 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ist  
30 das Wachstum des Pilzes auf transgenen Kartoffelknollen, die die  
Saccharoseisomerase exprimieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich  
reduziert.

Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso

35 Zur Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso wurde der Promotor des  
Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Lemmi9  
Promotor Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact  
12:440-449) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-  
40 Inhibitor II-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter  
die Kontrolle des "Feeding cell"-spezifischen Promotor gestellt.

Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Lemmi9-  
Promotors wurde bereits demonstriert (Escobar C et al. (1999)  
45 Mol Plant Microbe Interact 12:440-449). Das Plasmid pLemmi9-  
cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (siehe Fig. 7):

A) Fragment A beinhaltet den Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Das Fragment beinhaltet die Sequenz von 1417 bp vor dem Translationsstart (ATG) des Lemmi9-Gens und wurde als funktionelles Promoterfragment charakterisiert (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449, Accession Z69032). Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

Lem1: 5'atcGAATTCATAATTTAACCATCTAGAG 3' (SEQ ID NO: 28)

Lem2: 5'atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG 3' (SEQ ID NO: 29)

Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Lem1, EcoRI; Primer Lem2, Asp718.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

- genomische Tomaten-DNA (1 µg),
- Primer Lem1 und Lem2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die

Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch ist ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5

- C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426, Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

- 10 In pLemmi9-cwIso (Lemmi9 = Promotor des Lemmi9-Gens aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter Feeding cell-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15

Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pLemmi9-cwIso transformiert und ganze Kartoffelpflanzen wurden regeneriert.

20

Beispiel 9: Herstellung des Plasmids p $\Delta$ 0.3TobRB7-cwIso

- Zur Herstellung des Plasmids p $\Delta$ 0.3TobRB7-cwIso wurde der Promotor des des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den  
25  $\Delta$ 0.3TobRB7 Promotor (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter Feeding cell-spezifische Kontrolle gestellt.

- 30 Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen  $\Delta$ 0.3TobRB7-Promotors wurde bereits demonstriert (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223). Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase-Gens. Das Plasmid p $\Delta$ 0.3TobRB7-cwIso beinhaltet drei  
35 Fragmente A, B und C (Fig. 8):

- A) Fragment A beinhaltet den  $\Delta$ 0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*. Das Fragment beinhaltet die Region von -298 bp bis +76 des TobRB7-Gens befinden und als funktionelles Promotor-  
40 fragment charakterisiert wurden (Opperman et al. (1994) Science. 263: 221-223, Acc.-No.: S45406) . Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

45

Tob1:5'-GGAATTCAGCTTATCTAAACAAAGTTTAAATTC-3' (SEQ ID NO: 30)

Tob2: 5'-GGGTACCAGTTCTCACTAGAAAAATGCCCC-3' (SEQ ID NO: 31)

5 Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Tob1, EcoRI; Primer Tob2, Asp718.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

- 10
- genomische DNA aus Tabak (1 µg),
  - Primer Tob1 und Tob2 (jeweils 250 ng),
  - Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
  - 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
  - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

15 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei  
20 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels  
25 Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

30

- B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapsodici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert  
35 sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.
- 40 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

In pΔ0.3TobRB7-cwIso (Δ0.3TobRB7 = verkürzter Promotor des  
45 TobRB7-Gens aus Tabak, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter

"Feeding cell"-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels  
5 Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt  
pΔ0.3TobRB7-cwIso transformiert und Kartoffelpflanzen  
wurden regeneriert

Beispiel 10: Infektion der Pflanzen mit Nematoden

10

Transformierte Pflanzen werden mit Hilfe von npt-spezifischen  
Primern über PCR bestätigt. Zur Infektion mit Nematoden werden  
die Stecklinge von transgenen Linien, die die Saccharoseisomerase  
unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors  
15 exprimieren, zuerst auf Medium mit Kanamycin angezogen und  
später in Töpfe mit steriler Erde transferiert. Die Pflanzen  
werden bei 22°C (16 h Tag/8 h Nacht) angezogen. Die Infektion  
der Pflanzen wird wie folgt durchgeführt: 3 ml einer Suspension  
(ca. 500 J2-Larven) von Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-  
20 Arten) werden direkt neben den Stengeln der Pflanzen in die  
Erde inokuliert. Die Pflanzen werden nach 2 bis 3 Wochen aus  
den Töpfen entfernt und die Wurzeln gewaschen. Anschließend wird  
die gesamte Wurzel einer jeden Pflanze mit Hilfe eines Stereo-  
mikroskopes untersucht und die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem  
25 von transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen verglichen.

Transgene Pflanzen, die die Saccharoseisomerase unter Kontrolle  
eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zeigen  
eine deutliche Resistenz gegenüber endoparasitären Wurzel-  
30 nematoden. Die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem dieser Pflanzen  
nach Nematodenbefall ist im Vergleich zu nicht-transformierten  
Pflanzen signifikant reduziert.

35

40

45

# Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

## Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogen-induzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

10

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen  
5 mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei  
nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
- a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder  
10 einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
- b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen  
- im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus -  
15 die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht  
oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase  
beschrieben wird durch
- i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder  
20 18, oder
- ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß  
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18, oder  
25
- iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein  
gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die  
30 Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch  
eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine  
Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz  
35 gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder  
22, und
- b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer  
Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß  
40 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22  
aufweisen, und
- c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11,  
13, 15, 17, 19 oder 21, und  
45



- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresesequenz von c) degeneriert ist, und
- 5 e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 aufweisen, und
- 10 f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 hybridisieren.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promotors exprimiert wird.
- 15 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
- 20 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 25 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 30 8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder epidermis-spezifischen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
- 35 9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
- 40 10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare oder epidermis-spezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.
- 45

## 3

11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

25

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co.KGaa

&lt;120&gt; Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

&lt;130&gt; AE 20020427

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 34

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1890

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Protaminobacter rubrum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1887)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 1

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca	48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1 5 10 15	
tca tta tgc atc tca tgc cag caa gcc ttc ggt acg caa caa ccc ttg	96
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20 25 30	
ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
aag gag gct gtt ttt tat cag gtg tat ccg cgc tcc ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac gga gat ggc atc ggg gat att aac ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat cta aaa gcc ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tct ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgg aat atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgc ggc tat tat ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	

2

cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aat ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg tta cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgt ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gat ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gcg gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aaa gag gtc ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcg act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	
ata aag ttc ttc gat cgc cgc cgt gat gag ctg aac att gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gat tgg aaa ttg tcg caa ttc cgg cag atc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gca gga gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcg cac ttt ggc gat gat gat cgc cca caa	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Asp Arg Pro Gln	
370 375 380	
tgg cgt gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa	1200
Trp Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln	
385 390 395 400	
cga gca aca cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat	1248
Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn	
405 410 415	
tac ccg ttt aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt	1296
Tyr Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly	
420 425 430	
ttt tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtc aaa gcc gac gag ttc	1344
Phe Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe	
435 440 445	

3

```

ttg caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg acg ccg ttc 1392
Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe
450 455 460

caa tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg 1440
Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp
465 470 475 480

ttc aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc 1488
Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val
485 490 495

aca caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata 1536
Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile
500 505 510

agg cat gac atc ccg gca ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat 1584
Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp
515 520 525

cct gca aat gat tgc gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa 1632
Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu
530 535 540

aaa tat ctt gtt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa 1680
Lys Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys
545 550 555 560

tta ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc 1728
Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser
565 570 575

aaa aac gtg gtg aaa aag aat gat tca tta ctc gag cta aaa cca tgg 1776
Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp
580 585 590

cag tca ggg gtt tat aaa act aaa tca ata aat ctc ata gtc acg cca 1824
Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro
595 600 605

aat aat gta aat ata ttg aaa cta tta aaa ccg gca ttt tat gcc ggt 1872
Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly
610 615 620

ttt ttt agc gca aaa tag 1890
Phe Phe Ser Ala Lys
625

<210> 2
<211> 629
<212> PRT
<213> Protaminobacter rubrum

<400> 2
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
1 5 10 15
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu
20 25 30
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
35 40 45
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
50 55 60
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
65 70 75 80

```



5

Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp  
 465 470 475 480  
 Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val  
 485 490 495  
 Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile  
 500 505 510  
 Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp  
 515 520 525  
 Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu  
 530 535 540  
 Lys Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys  
 545 550 555 560  
 Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser  
 565 570 575  
 Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp  
 580 585 590  
 Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro  
 595 600 605  
 Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly  
 610 615 620  
 Phe Phe Ser Ala Lys  
 625

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1305

&lt;212&gt; DNA

<213> *Erwinia rhapsodica*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1305)

&lt;223&gt; coding for N-terminal fragment of sucrose isomerase

&lt;400&gt; 3

atg tcc tct caa gga ttg aaa acg gct ntc gct att ttt ctt gca acc 48  
 Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc nnn cca gat acc 96  
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr  
 20 25 30  
 gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg 144  
 Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp  
 35 40 45  
 aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg 192  
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr  
 50 55 60  
 aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac 240  
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp  
 65 70 75 80  
 tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac 288  
 Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr  
 85 90 95

6

gat	tcg	ccg	aat	acg	gat	aat	ggg	tat	gac	atc	cgg	gat	tac	cgt	aag	336
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Arg	Asp	Tyr	Arg	Lys	
			100					105					110			
ata	atg	aaa	gaa	tac	ggg	acg	atg	gaa	gac	ttt	gac	cgt	ctt	att	tca	384
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser	
		115					120					125				
gaa	atg	aag	aaa	cgc	aat	atg	cgt	ttg	atg	att	gat	att	gtt	atc	aac	432
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	
		130				135					140					
cac	acc	agc	gat	cag	cat	gcc	tgg	ttt	gtt	cag	agc	aaa	tcg	ggg	aag	480
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Ala	Trp	Phe	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Gly	Lys	
					150					155					160	
aac	aac	ccc	tac	agg	gac	tat	tac	ttc	tgg	cgt	gac	ggg	aag	gat	ggc	528
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Gly	
				165					170					175		
cat	gcc	ccc	aat	aac	tat	ccc	tcc	ttc	ttc	ggg	ggc	tca	gcc	tgg	gaa	576
His	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Glu	
			180					185					190			
aaa	gac	gat	aaa	tca	ggc	cag	tat	tac	ctc	cat	tac	ttt	gcc	aaa	cag	624
Lys	Asp	Asp	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln	
		195				200						205				
caa	ccc	gac	ctc	aac	tgg	gac	aat	ccc	aaa	gtc	cgt	caa	gac	ctg	tat	672
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr	
		210				215					220					
gac	atg	ctc	cgc	ttc	tgg	tta	gat	aaa	ggc	gtt	tct	ggg	tta	cgc	ttt	720
Asp	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe	
					230				235						240	
gat	acc	gtt	gcc	acc	tac	tcg	aaa	atc	ccg	aac	ttc	cct	gac	ctt	agc	768
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asn	Phe	Pro	Asp	Leu	Ser	
				245				250						255		
caa	cag	cag	tta	aaa	aat	ttc	gcc	gag	gaa	tat	act	aaa	ggg	cct	aaa	816
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys	
			260					265					270			
att	cac	gac	tac	gtg	aat	gaa	atg	aac	aga	gaa	gta	tta	tcc	cac	tat	864
Ile	His	Asp	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr	
			275				280					285				
gat	atc	gcc	act	gcg	ggg	gaa	ata	ttt	ggg	gtt	cct	ctg	gat	aaa	tcg	912
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Lys	Ser	
					295						300					
att	aag	ttt	ttc	gat	cgc	cgt	aga	aat	gaa	tta	aat	ata	gcg	ttt	acg	960
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Asn	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr		
	305				310				315					320		
ttt	gat	ctg	atc	agg	ctc	gat	cgt	gat	gct	gat	gaa	aga	tgg	cgg	cga	1008
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ala	Asp	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	
				325				330						335		
aaa	gac	tgg	acc	ctt	tcg	cag	ttc	cga	aaa	att	gtc	gat	aag	gtt	gac	1056
Lys	Asp	Trp	Thr	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Lys	Ile	Val	Asp	Lys	Val	Asp	
			340					345					350			
caa	acg	gca	gga	gag	tat	ggg	tgg	aat	gcc	ttt	ttc	tta	gac	aat	cac	1104
Gln	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His	
			355				360						365			



7

gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg 1152  
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp  
 370 375 380

cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt 1200  
 Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg  
 385 390 395 400

gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat 1248  
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr  
 405 410 415

ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt 1296  
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe  
 420 425 430

tgg caa gac 1305  
 Trp Gln Asp  
 435

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 435

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Erwinia rhapsodica

&lt;400&gt; 4

Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr  
 1 5 10 15

Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr  
 20 25 30

Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp  
 35 40 45

Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr  
 50 55 60

Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp  
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr  
 85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys  
 100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser  
 115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn  
 130 135 140

His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys  
 145 150 155 160

Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly  
 165 170 175

His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu  
 180 185 190

Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln  
 195 200 205

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr  
 210 215 220

Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe  
 225 230 235 240

8

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser  
 245 250 255  
 Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys  
 260 265 270  
 Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr  
 275 280 285  
 Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser  
 290 295 300  
 Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr  
 305 310 315 320  
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg  
 325 330 335  
 Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp  
 340 345 350  
 Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His  
 355 360 365  
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp  
 370 375 380  
 Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg  
 385 390 395 400  
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr  
 405 410 415  
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe  
 420 425 430  
 Trp Gln Asp  
 435

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1803

&lt;212&gt; DNA

<213> *Erwinia rhapontici*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1800)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 5

atg tcc tct caa gga ttg aaa acg gct gtc gct att ttt ctt gca acc 48  
 Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc ggg cca gat acc 96  
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr  
 20 25 30  
 gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg 144  
 Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp  
 35 40 45  
 aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg 192  
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr  
 50 55 60  
 aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac 240  
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp  
 65 70 75 80

9

tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac	288
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tcg ccg aat acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat cag cat gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag	480
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa	576
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag	624
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt	720
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acc gtt gcc acc tac tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser	
245 250 255	
caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys	
260 265 270	
att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat	864
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser	
290 295 300	
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gat ctg atc agg ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac	1056
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp	
340 345 350	

10

caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac	1104
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt	1200
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg caa gac tac gtt gaa aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aac gta cgc caa acc agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag	1392
Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat gca agc aaa aac gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta	1440
Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu	
465 470 475 480	
aaa atc aat ccc aat tat aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat	1488
Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn	
485 490 495	
aat cca aat tcc gta ttt aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc	1536
Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg	
500 505 510	
cat gac atc cct gcc ttg acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gac aac aat tca gtc tat gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa	1632
Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtg gtc att aat ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg	1680
Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu	
545 550 555 560	
ccc ggg gat tta tcc atc aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac	1728
Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His	
565 570 575	
act att gtg aat aaa aat gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag	1776
Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln	
580 585 590	
tcg ggc att tat aaa ctt aat ccg tag	1803
Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro	
595 600	

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 600

&lt;212&gt; PRT

<213> *Erwinia rhapontici*

&lt;400&gt; 6

Met	Ser	Ser	Gln	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Val	Ala	Ile	Phe	Leu	Ala	Thr
1				5					10					15	
Thr	Phe	Ser	Ala	Thr	Ser	Tyr	Gln	Ala	Cys	Ser	Ala	Gly	Pro	Asp	Thr
			20					25					30		
Ala	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Gln	Gln	Ser	Asn	Ala	Leu	Pro	Thr	Trp	Trp
		35					40					45			
Lys	Gln	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr
	50					55					60				
Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Ile	Glu	Asn	Leu	Asp
65					70					75				80	
Tyr	Leu	Lys	Lys	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr
				85					90					95	
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Arg	Asp	Tyr	Arg	Lys
			100					105					110		
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser
		115					120					125			
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Ile	Val	Ile	Asn
	130					135					140				
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Ala	Trp	Phe	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Gly	Lys
145					150					155				160	
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Gly
				165					170					175	
His	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Glu
			180					185					190		
Lys	Asp	Asp	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln
		195					200					205			
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr
	210					215					220				
Asp	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe
225					230					235				240	
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asn	Phe	Pro	Asp	Leu	Ser
				245					250					255	
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys
			260					265					270		
Ile	His	Asp	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr
		275					280					285			
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Lys	Ser
	290					295					300				
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asn	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr
305					310					315					320
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ala	Asp	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg
				325					330				335		
Lys	Asp	Trp	Thr	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Lys	Ile	Val	Asp	Lys	Val	Asp
			340					345					350		

12

Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His  
 355 360 365  
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp  
 370 375 380  
 Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg  
 385 390 395 400  
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr  
 405 410 415  
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe  
 420 425 430  
 Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu  
 435 440 445  
 Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln  
 450 455 460  
 Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu  
 465 470 475 480  
 Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn  
 485 490 495  
 Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg  
 500 505 510  
 His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro  
 515 520 525  
 Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys  
 530 535 540  
 Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His  
 565 570 575  
 Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln  
 580 585 590  
 Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro  
 595 600

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1803

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Protaminobacter rubrum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1800)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 7

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca 48  
 Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 tca tta tgc atc tca tgc cag caa gcc ttc ggt acg caa caa ccc ttg 96  
 Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu  
 20 25 30

13

ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
aag gag gct gtt ttt tat cag gtg tat ccg cgc tcc ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac gga gat ggc atc ggg gat att aac ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat cta aaa gcc ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tct ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgg aat atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgc ggc tat tat ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aat ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg tta cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgt ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gat ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gcg gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aaa gag gtc ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcg act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	

14

ata aag ttc ttc gat cgc cgc cgt gat gag ctg aac att gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gat tgg aaa ttg tcg caa ttc cgg cag atc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gca gga gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcg cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgt gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca aca cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccg ttt aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtc aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg acg ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc aca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr	
485 490 495	
caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500 505 510	
cat gac atc ccg gca ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat cct	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa	1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa tta	1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu	
545 550 555 560	
ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc aaa	1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys	
565 570 575	



15

aac gtg gtg aaa aag aat gat tca tta ctc gag cta aaa cca tgg cag 1776  
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln  
580 585 590

tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa 1803  
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln  
595 600

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 600

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Protaminobacter rubrum

&lt;400&gt; 8

Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr  
1 5 10 15

Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu  
20 25 30

Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp  
35 40 45

Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr  
50 55 60

Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp  
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr  
85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys  
100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser  
115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn  
130 135 140

His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys  
145 150 155 160

Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly  
165 170 175

Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln  
180 185 190

Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln  
195 200 205

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr  
210 215 220

Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe  
225 230 235 240

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr  
245 250 255

Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn  
260 265 270

Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr  
275 280 285

Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser  
290 295 300

16

Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr
305					310					315					320
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Arg	Trp	Arg	Arg
				325					330					335	
Lys	Asp	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Asp	Asn	Val	Asp
			340					345					350		
Arg	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
		355					360					365			
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
	370					375					380				
Arg	Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg
385					390					395					400
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr
				405					410					415	
Pro	Phe	Lys	Ala	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Phe
			420					425					430		
Trp	His	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Phe	Leu
		435					440					445			
Gln	Asn	Val	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln
	450					455					460				
Trp	Asp	Gly	Ser	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Phe
465					470					475					480
Lys	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Gln	Glu	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Thr
				485					490					495	
Gln	Pro	Asp	Ser	Val	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ile	Lys	Ile	Arg
		500					505						510		
His	Asp	Ile	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro
	515						520					525			
Ala	Asn	Asp	Ser	Val	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Lys
	530					535					540				
Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	Phe	Lys	Glu	Gln	Met	Met	Arg	Tyr	Lys	Leu
545					550					555					560
Pro	Asp	Asn	Leu	Ser	Ile	Glu	Lys	Val	Ile	Ile	Asp	Ser	Asn	Ser	Lys
			565					570					575		
Asn	Val	Val	Lys	Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	Lys	Pro	Trp	Gln
		580					585						590		
Ser	Gly	Val	Tyr	Lys	Leu	Asn	Gln								
	595					600									

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1794

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Enterobacter sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1791)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 9

atg tct ttt gtt acg cta cgt acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct 48

17

Met	Ser	Phe	Val	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	
1				5					10					15		
ttg	ata	ata	agt	ctg	gcc	tgc	ccg	gct	gtc	agt	gct	gca	cca	tcc	ttg	96
Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Leu	
			20					25					30			
aat	cag	gat	att	cac	gtt	caa	aag	gaa	agt	gaa	tat	cct	gca	tgg	tgg	144
Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp	
		35					40					45				
aaa	gaa	gct	gtt	ttt	tat	cag	atc	tat	cct	cgc	tca	ttt	aaa	gac	acc	192
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	
	50					55					60					
aat	gat	gat	ggc	att	ggc	gat	att	cgc	ggg	att	att	gaa	aag	ctg	gac	240
Asn	Asp	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	
	65				70					75					80	
tat	ctg	aaa	tgc	ctc	ggg	att	gac	gct	atc	tgg	atc	aat	ccc	cat	tac	288
Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr	
				85					90					95		
gac	tct	ccg	aac	acc	gat	aac	ggc	tat	gac	atc	agt	aat	tat	cgt	cag	336
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln	
			100					105					110			
ata	atg	aaa	gag	tat	ggc	aca	atg	gag	gat	ttt	gat	agc	ctt	gtt	gcc	384
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala	
		115					120					125				
gaa	atg	aaa	aaa	cga	aat	atg	cgc	tta	atg	atc	gac	gtg	gtc	att	aac	432
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	
	130					135					140					
cat	acc	agt	gat	caa	cac	ccg	tgg	ttt	att	cag	agt	aaa	agc	gat	aaa	480
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	
	145				150					155					160	
aac	aac	cct	tat	cgt	gac	tat	tat	ttc	tgg	cgt	gac	gga	aaa	gat	aat	528
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	
				165					170					175		
cag	cca	cct	aat	aat	tac	ccc	tca	ttt	ttc	ggc	ggc	tgc	gca	tgg	caa	576
Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	
			180					185					190			
aaa	gat	gca	aag	tca	gga	cag	tac	tat	tta	cac	tat	ttt	gcc	aga	cag	624
Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln	
		195					200					205				
caa	cct	gat	ctc	aac	tgg	gat	aac	ccg	aaa	gta	cgt	gag	gat	ctt	tac	672
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr	
	210					215					220					
gca	atg	ctc	cgc	ttc	tgg	ctg	gat	aaa	ggc	gtt	tca	ggc	atg	cga	ttt	720
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe	
	225				230				235						240	
gat	acg	gtg	gca	act	tat	tcc	aaa	atc	ccg	gga	ttt	ccc	aat	ctg	aca	768
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	
				245				250						255		
cct	gaa	caa	cag	aaa	aat	ttt	gct	gaa	caa	tac	acc	atg	ggd	cct	aat	816
Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	Met	Xaa	Pro	Asn	
			260					265					270			

18

att cat cga tac att cag gaa atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cgg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	
275 280 285	
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg	912
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	
290 295 300	
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	
305 310 315 320	
ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His	
325 330 335	
aag tcg tgg tcg ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat	1056
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp	
340 345 350	
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gac aac cat	1104
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg	1200
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc	1296
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu	
435 440 445	
gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag	1392
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt	1440
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac scc gaa cgc gaa gaa acc	1488
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Xaa Glu Arg Glu Glu Thr	
485 490 495	
cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc	1536
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg	
500 505 510	
cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca	1584
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro	
515 520 525	
cag gac aat acc gtt tat gcc tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt	1632
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg	
530 535 540	

19

tat	ctg	gtc	gtg	gtg	aac	ttt	aag	gag	tac	ccg	gtc	cgc	tat	act	ctc	1680
Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	Phe	Lys	Glu	Tyr	Pro	Val	Arg	Tyr	Thr	Leu	
545					550				555						560	
ccg	gct	aat	gat	gcc	atc	gag	gaa	gtg	gtc	att	gat	act	cag	cag	caa	1728
Pro	Ala	Asn	Asp	Ala	Ile	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Asp	Thr	Gln	Gln	Gln	
				565					570						575	
ggc	gcg	ccg	cac	agc	aca	tcc	ctg	tca	ttg	agc	ccc	tgg	cag	gca	ggc	1776
Gly	Ala	Pro	His	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Trp	Gln	Ala	Gly	
			580					585					590			
gcg	tat	aag	ctg	cgg	taa											1794
Ala	Tyr	Lys	Leu	Arg												
			595													

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 597

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Enterobacter sp.

&lt;400&gt; 10

Met	Ser	Phe	Val	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	
1				5					10					15		
Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Leu	
			20					25					30			
Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp	
		35					40					45				
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	
	50					55					60					
Asn	Asp	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	
65					70				75					80		
Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr	
				85					90					95		
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln	
			100					105					110			
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala	
		115					120					125				
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	
	130					135					140					
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	
145					150					155					160	
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	
				165					170					175		
Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	
			180					185						190		
Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln	
		195					200					205				
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr	
		210				215					220					
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe	
225					230					235					240	
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	
				245					250					255		

20

Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	Met	Xaa	Pro	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Arg	Tyr	Ile	Gln	Glu	Met	Asn	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Arg	Tyr
		275					280					285			
Asp	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Arg	Ser
	290				295						300				
Ser	Gln	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	His	Glu	Leu	Asn	Met	Ala	Phe	Met
305				310						315				320	
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asn	Glu	Arg	Trp	Arg	His
			325					330						335	
Lys	Ser	Trp	Ser	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Ser	Lys	Met	Asp
		340					345						350		
Val	Thr	Val	Gly	Lys	Tyr	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
	355						360					365			
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
	370				375						380				
Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg
385				390						395				400	
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr
			405				410							415	
Pro	Phe	Arg	Gln	Leu	Asn	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Phe
		420					425					430			
Trp	Gln	Asp	Tyr	Val	Gln	Ser	Gly	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Glu	Phe	Leu
	435						440					445			
Asp	Asn	Val	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln
	450				455						460				
Trp	Asn	Asp	Thr	Leu	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Arg	Gly	Lys	Pro	Trp	Phe
465				470					475					480	
His	Ile	Asn	Pro	Asn	Tyr	Val	Glu	Ile	Asn	Xaa	Glu	Arg	Glu	Glu	Thr
		485					490							495	
Arg	Glu	Asp	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Met	Ile	Gln	Leu	Arg
		500					505						510		
His	His	Ile	Pro	Ala	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Gln	Asp	Leu	Asn	Pro
	515						520					525			
Gln	Asp	Asn	Thr	Val	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Arg
	530					535					540				
Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	Phe	Lys	Glu	Tyr	Pro	Val	Arg	Tyr	Thr	Leu
545				550					555						560
Pro	Ala	Asn	Asp	Ala	Ile	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Asp	Thr	Gln	Gln	Gln
			565					570						575	
Gly	Ala	Pro	His	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Trp	Gln	Ala	Gly
		580					585						590		
Ala	Tyr	Lys	Leu	Arg											
		595													

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1803

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Serratia plymuthica

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1800)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 11

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca	48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1 5 10 15	
tca tta agc gtc tca tgc cag caa gcc tta ggt acg caa caa ccc ttg	96
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20 25 30	
ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
aag gag gct gtt ttt tat cag gtg tat ccg cgt tcc ttt aaa gac act	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac ggg gat ggt atc ggg gat att aaa ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat tta aaa gct ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gac tcc ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgt aac atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgt ggc tat tac ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aac ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ttg cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgc ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	

22

gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gac ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gct gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aga gaa gtt ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcc act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	
ata aaa ttc ttc gat cgc cgt cgc gat gag ctg aac atc gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gag tgg aaa ttg tcg caa ttc cga cag gtc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gcc ggc gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcc cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtg aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg aca ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat acg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
aag gtc aat cca aac tac cag gaa atc aat gcg gta agt caa gtc gca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala	
485 490 495	
cag ccc gac tcg gta ttt aat tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500 505 510	



23

cat aac atc ccg gca ctg acc tat ggc aca tac acc gat ttg gat cct 1584  
 His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro  
 515 520 525

gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa 1632  
 Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys  
 530 535 540

tat ctt gtt gtc gtt aac ttc cag gaa caa gtg atg aga tat aaa tta 1680  
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu  
 545 550 555 560

ccg gat aat cta tcc atc gag aaa gtg att ata gaa agc aac agc aaa 1728  
 Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys  
 565 570 575

aac gtt gtg aaa aag aat gat tcc tta ctc gaa cta aaa cca tgg cag 1776  
 Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln  
 580 585 590

tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa 1803  
 Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln  
 595 600

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 600

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Serratia plymuthica

&lt;400&gt; 12

Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu  
 20 25 30

Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp  
 35 40 45

Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr  
 50 55 60

Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp  
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr  
 85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys  
 100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser  
 115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn  
 130 135 140

His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys  
 145 150 155 160

Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly  
 165 170 175

Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln  
 180 185 190

Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln  
 195 200 205

Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr
210						215					220				
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe
225					230					235					240
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr
				245					250					255	
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Ala	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Arg	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr
		275					280					285			
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Gln	Ser
	290					295					300				
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr
305					310					315					320
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Arg	Trp	Arg	Arg
				325					330					335	
Lys	Glu	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Asp
			340					345					350		
Arg	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
		355					360					365			
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
	370					375				380					
Arg	Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg
385					390					395					400
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr
				405					410					415	
Pro	Phe	Lys	Ala	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Phe
			420					425					430		
Trp	His	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Phe	Leu
		435					440					445			
Gln	Asn	Val	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln
	450					455					460				
Trp	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Phe
465					470					475					480
Lys	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Gln	Glu	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Ala
				485					490					495	
Gln	Pro	Asp	Ser	Val	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ile	Lys	Ile	Arg
			500					505					510		
His	Asn	Ile	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro
		515					520					525			
Ala	Asn	Asp	Ser	Val	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Lys
	530					535					540				
Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	Phe	Gln	Glu	Gln	Val	Met	Arg	Tyr	Lys	Leu
545					550					555					560

Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln  
595 600

<210> 13

<211> 1844

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for fusion-protein of signal peptide from proteinase inhibitor I and Sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici*

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(1835)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (24)..(143)

<223> signal peptide from proteinase inhibitor I

<220>

<221> misc\_feature

<222> (144)..(1835)

<223> coding for mature peptide of sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* (palI)

<400> 13

```

ggtaccctaa ttaattatcc atc atg gat gtt cac aag gaa gtt'aat ttc gtt 53
          Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val
              1              5              10

gct tac cta cta att gtt ctt gga tta ttg gta ctt gta agc gcg atg 101
Ala Tyr Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met
              15              20              25

gag cat gtt gat gcg aag gct tgc acc gaa ttg ggg atc ctc acc gtt 149
Glu His Val Asp Ala Lys Ala Cys Thr Glu Leu Gly Ile Leu Thr Val
              30              35              40

cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg aag cag gct gtt ttt tat 197
Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val Phe Tyr
              45              50              55

cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg aat ggg gat ggc att ggg 245
Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly
              60              65              70

gat tta aac ggt att att gag aat tta gac tat ctg aag aaa ctg ggt 293
Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys Leu Gly
              75              80              85              90

att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac gat tcg ccg aat acg gat 341
Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp
              95              100              105

aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag ata atg aaa gaa tac ggt 389
Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly
              110              115              120

acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca gaa atg aag aaa cgc aat 437
Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys Arg Asn
              125              130              135

```

26

atg	cgt	ttg	atg	att	gat	att	gtt	atc	aac	cac	acc	agc	gat	cag	cat	485
Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	
140						145					150					
gcc	tgg	ttt	gtt	cag	agc	aaa	tcg	ggt	aag	aac	aac	ccc	tac	agg	gac	533
Ala	Trp	Phe	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Gly	Lys	Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	
155					160					165					170	
tat	tac	ttc	tgg	cgt	gac	ggt	aag	gat	ggc	cat	gcc	ccc	aat	aac	tat	581
Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Gly	His	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	
				175					180						185	
ccc	tcc	ttc	ttc	ggt	ggc	tca	gcc	tgg	gaa	aaa	gac	gat	aaa	tca	ggc	629
Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Glu	Lys	Asp	Asp	Lys	Ser	Gly	
			190					195					200			
cag	tat	tac	ctc	cat	tac	ttt	gcc	aaa	cag	caa	ccc	gac	ctc	aac	tgg	677
Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln	Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	
			205				210					215				
gac	aat	ccc	aaa	gtc	cgt	caa	gac	ctg	tat	gac	atg	ctc	cgc	ttc	tgg	725
Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	
			220			225					230					
tta	gat	aaa	ggc	gtt	tct	ggt	tta	cgc	ttt	gat	acc	gtt	gcc	acc	tac	773
Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe	Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	
235					240				245						250	
tcg	aaa	atc	ccg	aac	ttc	cct	gac	ctt	agc	caa	cag	cag	tta	aaa	aat	821
Ser	Lys	Ile	Pro	Asn	Phe	Pro	Asp	Leu	Ser	Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	
				255				260							265	
ttc	gcc	gag	gaa	tat	act	aaa	ggt	cct	aaa	att	cac	gac	tac	gtg	aat	869
Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys	Ile	His	Asp	Tyr	Val	Asn	
			270					275					280			
gaa	atg	aac	aga	gaa	gta	tta	tcc	cac	tat	gat	atc	gcc	act	gcg	ggg	917
Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr	Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	
			285				290					295				
gaa	ata	ttt	ggg	gtt	cct	ctg	gat	aaa	tcg	att	aag	ttt	ttc	gat	cgc	965
Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Lys	Ser	Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	
			300			305					310					
cgt	aga	aat	gaa	tta	aat	ata	gcg	ttt	acg	ttt	gat	ctg	atc	agg	ctc	1013
Arg	Arg	Asn	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr	Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	
315					320					325					330	
gat	cgt	gat	gct	gat	gaa	aga	tgg	cgg	cga	aaa	gac	tgg	acc	ctt	tcg	1061
Asp	Arg	Asp	Ala	Asp	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Asp	Trp	Thr	Leu	Ser	
				335					340						345	
cag	ttc	cga	aaa	att	gtc	gat	aag	gtt	gac	caa	acg	gca	gga	gag	tat	1109
Gln	Phe	Arg	Lys	Ile	Val	Asp	Lys	Val	Asp	Gln	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	
			350					355					360			
ggg	tgg	aat	gcc	ttt	ttc	tta	gac	aat	cac	gac	aat	ccc	cgc	gcg	gtt	1157
Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His	Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	
			365				370					375				
tct	cac	ttt	ggt	gat	gat	cga	cca	caa	tgg	cgc	gag	cat	gcg	gcg	aaa	1205
Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp	Arg	Glu	His	Ala	Ala	Lys	
			380			385					390					
gca	ctg	gca	aca	ttg	acg	ctg	acc	cag	cgt	gca	acg	ccg	ttt	atc	tat	1253
Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	
395					400				405						410	

27

```

cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat ccc ttt aaa aaa atc gat 1301
Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp
      415                                420                        425

gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt tgg caa gac tac gtt gaa 1349
Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu
      430                                435                        440

aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt caa aac gta cgc caa acc 1397
Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr
      445                                450                        455

agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag tgg gat gca agc aaa aac 1445
Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn
      460                                465                        470

gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta aaa atc aat ccc aat tat 1493
Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr
      475                                480                        485                        490

aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat aat cca aat tcc gta ttt 1541
Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe
      495                                500                        505

aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc cat gac atc cct gcc ttg 1589
Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu
      510                                515                        520

acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct gac aac aat tca gtc tat 1637
Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr
      525                                530                        535

gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa tat ctt gtg gtc att aat 1685
Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val Ile Asn
      540                                545                        550

ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg ccc ggg gat tta tcc atc 1733
Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu Ser Ile
      555                                560                        565                        570

aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac act att gtg aat aaa aat 1781
Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn Lys Asn
      575                                580                        585

gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag tcg ggc att tat aaa ctt 1829
Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Leu
      590                                595                        600

aat ccg taggtcgac 1844
Asn Pro

<210> 14
<211> 604
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for
      fusion-protein of signal peptide from proteinase
      inhibitor I and Sucrose isomerase from Erwinia
      rhapontici

<400> 14
Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val Ala Tyr Leu Leu Ile Val
  1              5              10              15
Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met Glu His Val Asp Ala Lys
      20              25              30

```



29

Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu  
 420 425 430

Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala  
 435 440 445

Glu Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg  
 450 455 460

Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly  
 465 470 475 480

Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala  
 485 490 495

Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu  
 500 505 510

Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile  
 515 520 525

Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu  
 530 535 540

Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met  
 545 550 555 560

His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu  
 565 570 575

Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu  
 580 585 590

Glu Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro  
 595 600

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 2477

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Klebsiella sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (214)..(2007)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 15

gatatacttg gtattatgga gtattatact ccccccttat ttactcatca aagccaggcg 60  
 ttccactctg cctccggtat ataactttcc gggaaacaat cccttcctga aaataattat 120  
 tgttaccgga gtcatactct ggctattgat gatttacgct tttctttaat aacaattcgt 180  
 ctcattcaca actgactttg caaggaaatt att atg tct ttt gtt acg cta cgt 234  
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg  
 1 5

acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct ttg ata ata agt ctg gcc tgc 282  
 Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys  
 10 15 20

ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg aat cag gat att cac gtt caa 330  
 Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu Asn Gln Asp Ile His Val Gln  
 25 30 35

aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg aaa gaa gct gtt ttt tat cag 378  
 Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln  
 40 45 50 55

30

atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat ggc att ggc gat	426
Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp	
60 65 70	
att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa tcg ctc ggt att	474
Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile	
75 80 85	
gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg aac acc gat aac	522
Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn	
90 95 100	
ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa gag tat ggc aca	570
Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr	
105 110 115	
atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa aaa cga aat atg	618
Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys Lys Arg Asn Met	
120 125 130 135	
cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac cat acc agt gat caa cac ccg	666
Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His Pro	
140 145 150	
tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa aac aac cct tat cgt gac tat	714
Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr	
155 160 165	
tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat cag cca cct aat aat tac ccc	762
Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro	
170 175 180	
tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa aaa gat gca aag tca gga cag	810
Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln	
185 190 195	
tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag caa cct gat ctc aac tgg gat	858
Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp	
200 205 210 215	
aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac gca atg ctc cgc ttc tgg ctg	906
Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu	
220 225 230	
gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt gat acg gtg gca act tat tcc	954
Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser	
235 240 245	
aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca cct gaa caa cag aaa aat ttt	1002
Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe	
250 255 260	
gct gaa caa tac acc atg ggg cct aat att cat cga tac att cag gaa	1050
Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu	
265 270 275	
atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cgg tat gat gtg gcc acc gcg ggt gaa	1098
Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu	
280 285 290 295	
att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg tcg cag ttt ttt gat cgc cgc	1146
Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg	
300 305 310	
cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg ttt gac ctc att cgt ctc gat	1194
Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp	
315 320 325	



31

cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac aag tgc tgg tgc ctc tct cag	1242
Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln	
330 335 340	
ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat gtc acg gtc gga aag tat ggc	1290
Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly	
345 350 355	
tgg aac acg ttc ttc tta gat aac cat gac aac ccc cgt gcg gta tct	1338
Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser	
360 365 370 375	
cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg cgg gag gcg tgc gct aag gca	1386
His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala	
380 385 390	
ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg gcg acg ccg ttt att tat cag	1434
Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln	
395 400 405	
ggt tca gag ctg gga atg act aat tat ccc ttc agg caa ctc aac gaa	1482
Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu	
410 415 420	
ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc tgg cag gat tat gtc cag agt	1530
Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser	
425 430 435	
gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc gat aat gtg cgc ctg acg agc	1578
Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser	
440 445 450 455	
cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag tgg aat gac acc ctg aat gct	1626
Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala	
460 465 470	
ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt cac atc aac cca aac tat gtg	1674
Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe His Ile Asn Pro Asn Tyr Val	
475 480 485	
gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc cgc gaa gat tca gtg ctg aat	1722
Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn	
490 495 500	
tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc cac cat atc cct gct ctg gta	1770
Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg His His Ile Pro Ala Leu Val	
505 510 515	
tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca cag gac aat acc gtt tat gcc	1818
Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala	
520 525 530 535	
tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt tat ctg gtc gtg gtg aac ttt	1866
Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg Tyr Leu Val Val Val Asn Phe	
540 545 550	
aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc ccg gct aat gat gcc atc gag	1914
Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu	
555 560 565	
gaa gtg gtc att gat act cag cag cag gcg gct gcg ccg cac agc aca	1962
Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln Ala Ala Ala Pro His Ser Thr	
570 575 580	
tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca ggt gtg tat aag ctg cgg	2007
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly Val Tyr Lys Leu Arg	
585 590 595	

32

taatcacctg ggggattgat gacaagttcc ccagacaata gagttttcca ggtcttttagc 2067  
 actgctgtgc tcagcgatag ttgtgctctc ctgtgacttc gtaagtgcct gtctcatggc 2127  
 aggcattgtc aggtcagaag ccttctcagg cagcctcgag taacagcgcc cagtttagcat 2187  
 cccctgaaa gatggggggt atgtataaat tagcgtaaaa gaacatgaac cagccaccgt 2247  
 catcttatca accaacaggc gagatgagct ccgattcctg attcttcaca ttgccgttga 2307  
 tgcgcctgaa gcctcgcctt ttagggccgg gaaataagca cagcatctgg cgatctcttt 2367  
 tgccacttta ctgatcacat ccggcctcat ccatttccgg gcggcttcag ccatacaggag 2427  
 aaagggtagt ggtcgtgtat atgagccagg ccaaaaaaag gtgtgatatc 2477

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 598

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Klebsiella sp.

&lt;400&gt; 16

Met	Ser	Phe	Val	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	1	5	10	15
Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Leu	20	25	30	
Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp	35	40	45	
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	50	55	60	
Asn	Asp	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	65	70	75	80
Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr	85	90	95	
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln	100	105	110	
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala	115	120	125	
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	130	135	140	
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	145	150	155	160
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	165	170	175	
Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	180	185	190	
Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln	195	200	205	
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr	210	215	220	
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe	225	230	235	240
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	245	250	255	
Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Asn	260	265	270	

33

Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr  
275 280 285

Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser  
290 295 300

Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met  
305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His  
325 330 335

Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp  
340 345 350

Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His  
355 360 365

Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp  
370 375 380

Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg  
385 390 395 400

Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr  
405 410 415

Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe  
420 425 430

Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu  
435 440 445

Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln  
450 455 460

Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe  
465 470 475 480

His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr  
485 490 495

Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg  
500 505 510

His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro  
515 520 525

Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg  
530 535 540

Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu  
545 550 555 560

Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln  
565 570 575

Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala  
580 585 590

Gly Val Tyr Lys Leu Arg  
595

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1797

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Klebsiella sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1794)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 17

atg tct ttt gtt acg cta cgt acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct	48
Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser	
1 5 10 15	
ttg ata ata agt ctg gcc tgc ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg	96
Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu	
20 25 30	
aat cag gat att cac gtt caa aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg	144
Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp	
35 40 45	
aaa gaa gct gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aat gat gat ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac	240
Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat ctg aaa tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac	288
Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gac tct ccg aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln	
100 105 110	
ata atg aaa gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cat acc agt gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa	480
His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys	
145 150 155 160	
aac aac cct tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn	
165 170 175	
cag cca cct aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa	576
Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gca aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag	624
Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
195 200 205	
caa cct gat ctc aac tgg gat aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ctc cgc ttc tgg ctg gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gtg gca act tat tcc aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	

35

cct gaa caa cag aaa aat ttt gct gaa caa tac acc atg ggg cct aat	816
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cga tac att cag gaa atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cgg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	
275 280 285	
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tgc	912
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	
290 295 300	
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	
305 310 315 320	
ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His	
325 330 335	
aag tcg tgg tgc ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat	1056
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp	
340 345 350	
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gat aac cat	1104
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg	1200
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc	1296
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu	
435 440 445	
gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag	1392
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt	1440
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc	1488
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr	
485 490 495	
cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc	1536
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg	
500 505 510	
cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca	1584
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro	
515 520 525	

36

cag gac aat acc gtt tat gcc tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt 1632  
 Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg  
 530 535 540  
 tat ctg gtc gtg gtg aac ttt aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc 1680  
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu  
 545 550 555 560  
 ccg gct aat gat gcc atc gag gaa gtg gtc att gat act cag cag cag 1728  
 Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln  
 565 570 575  
 gcg gct gcg ccg cac agc aca tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca 1776  
 Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala  
 580 585 590  
 ggt gtg tat aag ctg cgg taa 1797  
 Gly Val Tyr Lys Leu Arg  
 595

<210> 18  
 <211> 598  
 <212> PRT  
 <213> Klebsiella sp.

<400> 18  
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu  
 20 25 30  
 Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp  
 35 40 45  
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr  
 50 55 60  
 Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr  
 85 90 95  
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln  
 100 105 110  
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala  
 115 120 125  
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn  
 130 135 140  
 His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys  
 145 150 155 160  
 Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn  
 165 170 175  
 Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln  
 180 185 190  
 Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln  
 195 200 205  
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr  
 210 215 220  
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe  
 225 230 235 240

37

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr	245	250	255
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn	260	265	270
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	275	280	285
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	290	295	300
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	305	310	320
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His	325	330	335
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp	340	345	350
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His	355	360	365
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	370	375	380
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg	385	390	400
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	405	410	415
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	420	425	430
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu	435	440	445
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	450	455	460
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe	465	470	475
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr	485	490	495
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg	500	505	510
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro	515	520	525
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg	530	535	540
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu	545	550	555
Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln	565	570	575
Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala	580	585	590
Gly Val Tyr Lys Leu Arg	595		

<210> 19  
<211> 471  
<212> DNA  
<213> Enterobacter sp.  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(471)  
<223> coding for fragment of sucrose isomerase

<400> 19  
gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat 48  
Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp  
1 5 10 15  
ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa 96  
Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys  
20 25 30  
tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg 144  
Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro  
35 40 45  
aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa 192  
Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys  
50 55 60  
gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa 240  
Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys  
65 70 75 80  
aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac cat acc agt 288  
Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser  
85 90 95  
gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa aac aac cct 336  
Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro  
100 105 110  
tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat cag cca cct 384  
Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro  
115 120 125  
aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa aaa gat gca 432  
Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala  
130 135 140  
aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag 471  
Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln  
145 150 155

<210> 20  
<211> 157  
<212> PRT  
<213> Enterobacter sp.

<400> 20  
Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp  
1 5 10 15  
Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys  
20 25 30  
Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro  
35 40 45  
Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys  
50 55 60



39

Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala	Glu	Met	Lys
65					70					75					80
Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Thr	Ser
				85					90					95	
Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro
			100					105					110		
Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	Gln	Pro	Pro
		115					120					125			
Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	Lys	Asp	Ala
		130				135					140				
Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln			
145					150					155					

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 1782

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudomonas mesoacidophila MX45

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1779)

&lt;223&gt; coding for sucrose isomerase

&lt;400&gt; 21

atg	ctt	atg	aag	aga	tta	ttc	gcc	gcg	tct	ctg	atg	ctt	gct	ttt	tca	48
Met	Leu	Met	Lys	Arg	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Leu	Met	Leu	Ala	Phe	Ser	
1				5					10					15		
agc	gtc	tcc	tct	gtg	agg	gct	gag	gag	gcc	gta	aag	ccg	ggc	gcg	cca	96
Ser	Val	Ser	Ser	Val	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	
			20				25						30			
tgg	tgg	aaa	agt	gct	gtc	ttc	tat	cag	gtc	tat	ccg	cgc	tcg	ttc	aag	144
Trp	Trp	Lys	Ser	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	
		35				40					45					
gat	acc	aac	ggg	gat	ggg	atc	ggc	gat	ttc	aaa	gga	ctg	acg	gag	aag	192
Asp	Thr	Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Phe	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Lys	
	50				55					60						
ctc	gac	tat	ctc	aag	ggg	ctc	ggc	ata	gac	gcc	atc	tgg	atc	aat	cca	240
Leu	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	
65				70					75					80		
cat	tac	gcg	tct	ccc	aac	acc	gat	aat	ggc	tac	gat	atc	agc	gac	tat	288
His	Tyr	Ala	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asp	Tyr	
			85					90					95			
cga	gag	gtc	atg	aag	gaa	tat	ggg	acg	atg	gag	gac	ttc	gat	cgt	ctg	336
Arg	Glu	Val	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Leu	
			100				105					110				
atg	gct	gag	ttg	aag	aag	cgc	ggc	atg	cgg	ctc	atg	gtt	gat	gtc	gtg	384
Met	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly	Met	Arg	Leu	Met	Val	Asp	Val	Val	
		115					120					125				
atc	aac	cat	tcg	agt	gac	caa	cac	gaa	tgg	ttc	aag	agc	agc	cgg	gcc	432
Ile	Asn	His	Ser	Ser	Asp	Gln	His	Glu	Trp	Phe	Lys	Ser	Ser	Arg	Ala	
	130					135					140					
tcc	aaa	gac	aat	ccc	tac	cgt	gac	tat	tat	ttc	tgg	cgt	gac	ggc	aaa	480
Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	
145					150					155					160	

40

gac ggt cac gag cca aac aat tac cct tcc ttc ttc ggc ggt tcg gca	528
Asp Gly His Glu Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala	
165 170 175	
tgg gag aag gac ccc gta acc ggg caa tat tac ctg cat tat ttc ggt	576
Trp Glu Lys Asp Pro Val Thr Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Gly	
180 185 190	
cgt cag cag cca gat ctg aac tgg gac acg ccg aag ctt cgc gag gaa	624
Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Thr Pro Lys Leu Arg Glu Glu	
195 200 205	
ctc tat gcg atg ctg cgg ttc tgg ctc gac aag ggc gta tca ggc atg	672
Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met	
210 215 220	
cgg ttc gat acg gtg gct acc tac tcg aag aca ccg ggt ttc ccg gat	720
Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Thr Pro Gly Phe Pro Asp	
225 230 235 240	
ctg aca ccg gag cag atg aag aac ttc gcg gag gcc tat acc cag ggg	768
Leu Thr Pro Glu Gln Met Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Gln Gly	
245 250 255	
ccg aac ctt cat cgt tac ctg cag gaa atg cac gag aag gtc ttc gat	816
Pro Asn Leu His Arg Tyr Leu Gln Glu Met His Glu Lys Val Phe Asp	
260 265 270	
cat tat gac gcg gtc acg gcc ggc gaa atc ttc ggc gct ccg ctc aat	864
His Tyr Asp Ala Val Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Ala Pro Leu Asn	
275 280 285	
caa gtg ccg ctg ttc atc gac agc cgg agg aaa gag ctg gat atg gct	912
Gln Val Pro Leu Phe Ile Asp Ser Arg Arg Lys Glu Leu Asp Met Ala	
290 295 300	
ttc acc ttc gat ctg atc cgt tat gat cgc gca ctg gat cgt tgg cat	960
Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Tyr Asp Arg Ala Leu Asp Arg Trp His	
305 310 315 320	
acc att ccg cgt acc tta gcg gac ttc cgt caa acg atc gat aag gtc	1008
Thr Ile Pro Arg Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Thr Ile Asp Lys Val	
325 330 335	
gac gcc atc gcg ggc gaa tat ggc tgg aac acg ttc ttc ctc ggc aat	1056
Asp Ala Ile Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Gly Asn	
340 345 350	
cac gac aat ccc cgt gcg gta tcg cat ttt ggt gac gat cgg ccg caa	1104
His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln	
355 360 365	
tgg cgc gaa gcc tcg gcc aag gct ctg gcc acc gtc acc ttg acc cag	1152
Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu Thr Gln	
370 375 380	
cga gga acg ccg ttc atc ttc caa gga gat gaa ctc gga atg acc aac	1200
Arg Gly Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn	
385 390 395 400	
tac ccc ttc aag acg ctg cag gac ttt gat gat atc nnn nnn nnn nnn	1248
Tyr Pro Phe Lys Thr Leu Gln Asp Phe Asp Asp Ile Xaa Xaa Xaa Xaa	
405 410 415	
nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn	1296
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
420 425 430	

41

```

nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnt gtg gcg ttg act 1344
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ala Leu Thr
      435                      440                      445

agc cga gca aac gcc cgc acg ccc ttt caa tgg gat gac agt gct aat 1392
Ser Arg Ala Asn Ala Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Asp Ser Ala Asn
      450                      455                      460

gcg gga ttc aca act ggc aag cct tgg cta aag gtc aat cca aac tac 1440
Ala Gly Phe Thr Thr Gly Lys Pro Trp Leu Lys Val Asn Pro Asn Tyr
465                      470                      475                      480

act gag atc aac gcc gcg cgg gaa att ggc gat cct aaa tcg gtc tac 1488
Thr Glu Ile Asn Ala Ala Arg Glu Ile Gly Asp Pro Lys Ser Val Tyr
      485                      490                      495

agc ttt tac cgc aac ctg atc tca atc cgg cat gaa act ccc gct ctt 1536
Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Ser Ile Arg His Glu Thr Pro Ala Leu
      500                      505                      510

tcg acc ggg agc tat cgc gac atc gat ccg agt aat gcc gat gtc tat 1584
Ser Thr Gly Ser Tyr Arg Asp Ile Asp Pro Ser Asn Ala Asp Val Tyr
      515                      520                      525

gcc tat acg cgc agc cag gat ggc gag acc tat ctg gtc gta gtc aac 1632
Ala Tyr Thr Arg Ser Gln Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Val Val Val Asn
      530                      535                      540

ttc aag gca gag cca agg agt ttc acg ctt ccg gac ggc atg cat att 1680
Phe Lys Ala Glu Pro Arg Ser Phe Thr Leu Pro Asp Gly Met His Ile
545                      550                      555                      560

gcc gaa acc ctg att gag agc agt tcg cca gca gct ccg gcg gcg ggg 1728
Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
      565                      570                      575

gct gca agc ctt gag ctg cag cct tgg cag tcc ggc atc tac aag gtg 1776
Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Val
      580                      585                      590

aag taa 1782
Lys

<210> 22
<211> 593
<212> PRT
<213> Pseudomonas mesoacidophila MX45

<400> 22
Met Leu Met Lys Arg Leu Phe Ala Ala Ser Leu Met Leu Ala Phe Ser
  1                      5                      10                      15
Ser Val Ser Ser Val Arg Ala Glu Glu Ala Val Lys Pro Gly Ala Pro
      20                      25                      30
Trp Trp Lys Ser Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys
      35                      40                      45
Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Phe Lys Gly Leu Thr Glu Lys
      50                      55                      60
Leu Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro
      65                      70                      75                      80
His Tyr Ala Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr
      85                      90                      95
Arg Glu Val Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu
      100                      105                      110

```

42

Met	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly	Met	Arg	Leu	Met	Val	Asp	Val	Val	115	120	125
Ile	Asn	His	Ser	Ser	Asp	Gln	His	Glu	Trp	Phe	Lys	Ser	Ser	Arg	Ala	130	135	140
Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	145	150	155
Asp	Gly	His	Glu	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	165	170	175
Trp	Glu	Lys	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Gly	180	185	190
Arg	Gln	Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Thr	Pro	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	195	200	205
Leu	Tyr	Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	210	215	220
Arg	Phe	Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Asp	225	230	235
Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Met	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Ala	Tyr	Thr	Gln	Gly	245	250	255
Pro	Asn	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Gln	Glu	Met	His	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	260	265	270
His	Tyr	Asp	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn	275	280	285
Gln	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Arg	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Met	Ala	290	295	300
Phe	Thr	Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Tyr	Asp	Arg	Ala	Leu	Asp	Arg	Trp	His	305	310	315
Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Leu	Ala	Asp	Phe	Arg	Gln	Thr	Ile	Asp	Lys	Val	325	330	335
Asp	Ala	Ile	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Gly	Asn	340	345	350
His	Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	355	360	365
Trp	Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gln	370	375	380
Arg	Gly	Thr	Pro	Phe	Ile	Phe	Gln	Gly	Asp	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	385	390	395
Tyr	Pro	Phe	Lys	Thr	Leu	Gln	Asp	Phe	Asp	Asp	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	405	410	415
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	420	425	430
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Ala	Leu	Thr	435	440	445
Ser	Arg	Ala	Asn	Ala	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln	Trp	Asp	Asp	Ser	Ala	Asn	450	455	460
Ala	Gly	Phe	Thr	Thr	Gly	Lys	Pro	Trp	Leu	Lys	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	465	470	475
Thr	Glu	Ile	Asn	Ala	Ala	Arg	Glu	Ile	Gly	Asp	Pro	Lys	Ser	Val	Tyr	485	490	495

43

Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Ser Ile Arg His Glu Thr Pro Ala Leu  
500 505 510  
Ser Thr Gly Ser Tyr Arg Asp Ile Asp Pro Ser Asn Ala Asp Val Tyr  
515 520 525  
Ala Tyr Thr Arg Ser Gln Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Val Val Val Asn  
530 535 540  
Phe Lys Ala Glu Pro Arg Ser Phe Thr Leu Pro Asp Gly Met His Ile  
545 550 555 560  
Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly  
565 570 575  
Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Val  
580 585 590

Lys

<210> 23  
<211> 1417  
<212> DNA  
<213> Lycopersicon esculentum

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(1417)  
<223> promoter of lemni9

<400> 23  
ataatttaac catctagaga tccacaaatc atgtttccat atcatggtag tagttggtgc 60  
tacgaagtat ctataaatta ttgagaaata cctggtggaa tcccaagtga aacggaaagg 120  
cccttactta ttaaataaaa aaacatttga caatagaaaa ttgagaccaa tctgcatatg 180  
aaacatcagg atccccacat ttcacaaatt ttacaagtta attagccct actctgtcca 240  
tatggaactt ttctgcactt ccacgcacca acgaatatgc tgaaaattga tgttttagat 300  
gtgtacgaat aaagcaatca aagaacgcgg gcgcaacgcg cgctggagac actgccattc 360  
atgtgtgcct aacgtgtttt ctttagtcat tacgctccta ctaccgactc aatatatatt 420  
aactatagta ttttttattt atgacgagaa acgtaatttt aaatgtagat atattttaac 480  
aagctatgat aattacatct tgttgccgta gtcataaatg acacaaatta aggtttgatt 540  
ttcgtccact tctaagattt cttgttctaa tactagtata tttctgattt aaaaagttat 600  
ttagtttttt ttgaattagc tgataaatgc caaaaactga aaattaaagt actttttaat 660  
tttataaaaa taatatcatg gaaattaaaa cgagaaatta atgaaaaagt agaagattgc 720  
tttgccataa tatagtgtta cttttcgtat tattttatta agcgtaaaat tacataaagg 780  
tatccgtgct taaatttcta gcttgagagc attttttgaa gcaaaagttt cgataaatca 840  
agttttaata taaaattaca atcatcattt ctaattatat taattcttta aaaataaaat 900  
taaaaaaata tatacaataa ttgaagctcg gataaattaa aatatgtaac tattaatat 960  
tactcggata tattaaatat tattcgatta tattaatatg tagctcaaaa tatattaaat 1020  
aataatacaa atatattaat atatgtaaat catatacat aaaaactatc ttaaatatat 1080  
aatatgcagc tgtaatatat taaccagat acataagcac ctcgagtaca ttaacaaat 1140  
aaaagaattt aaaaataata aaaataagtg aaagcaataa attgtatatt tctataattt 1200  
atccctttat taatactaaa taaagttaga gaacctaaac aggaagcaca attatgacac 1260  
gaggagagaa tagcgcgtca attgtgaccc tttagcgga agtatatgta ataaatagta 1320  
gactcttttt ctatatattgt atatcccata acaagagcag agatattcgt ttagcacaaa 1380  
acaggcatatc tattcaattc ctttcgttc cagaagc 1417

<210> 24  
<211> 374  
<212> DNA  
<213> Nicotiana tabacum

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(374)  
<223> promoter of delta-0.3TobRB7  
<400> 24  
agcttatcta aacaaagttt taaattcatt tcttaaagct ccattacaat gtaatataac 60  
ttagtcgtct caattaaacc attaatgtga aatataaatc aaaaaagcc aaagggcggt 120  
gggacggcgc caatcatttg tcctagtcca ctcaaataag gcccatgggc ggcaaaacca 180  
aacacaaaat gtgttatttt taattttttc ctctttttatt gttaaagttg caaaatgtgt 240  
tatttttggt aagaccctat ggatatataa agacagggtta tgtgaaactt ggaaaaccat 300  
caagttttta gcaaaaccct cttaagaact taaattgagc ttcttttggg gcatttttct 360  
agtgagaact aaaa 374  
<210> 25  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 25  
ggatccggta ccgttcagca atcaaat 27  
<210> 26  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 26  
gtcgacgtct tgccaaaaac ctt 23  
<210> 27  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 27  
gtcgacctac gtgattaagt ttata 25  
<210> 28  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 28  
atcgaattca taatttaacc atctagag 28  
<210> 29  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 29

atcgggtacct gcttctggaa cgaaaggg

28

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 30

ggaattcagc ttatctaaac aaagttttaa attc

34

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 31

gggtaccagt tctcactaga aaaatgcccc

30

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 461

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Wheat dwarf virus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(461)

&lt;223&gt; V-sense promoter from Wheat Dwarf Virus

&lt;400&gt; 32

ccggcaggtc cttagcgaaa aaacgggggtg tgccagaaaa ctctatgctc taccctgcgt 60  
ggaggtgtga attctgcaca ctgctaagtc aatgtgtcca atgctttata tagggcaggt 120  
tttggcggga gaacagggcc cttgtgttcc cacgggagcg tagcgatcg tgtgggccct 180  
gttcggtgtg tggtcggggg gcctccacgc gggttataat attacccgc gtggtggccc 240  
ccgacgcgca ctcggtttt cgtgagtgcg cggaggctt tggaccacat cttttctgac 300  
cactttcgtg gaatatgttg atttatcaca cttttgacgc ggaaatctgt gccatgcctt 360  
agcttataag gaagtgcgtg gtagcccatc tcgatggagc aggcaatagc cccccgctt 420  
cctatacggg actatcaata ccagaccct tccattcccc g 461

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 1173

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Maize streak virus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(1173)

&lt;223&gt; V-sense promotor from Maize Streak Virus

&lt;400&gt; 33

aagcttattt gcagagtatt caaaatactg caattttgtg gaccaatcaa aggggaagctc 60  
tttctggatc atggagaggt actcttctt ggaagtagcg tgtgaaataa tgtctcgcat 120  
tatttcacat ttagaaggct ttttttcctt tacctctgaa tcagattttc cgaggaaggg 180

```
ggacttccta ggaatgaaag tacctctctc aaacacagcc agaggttcct tgagaatgta 240
atccctcacc ctgtttactg acttggcact ctgaatatct gggtgaaacc catttatatc 300
aaagaacctt gagtcagata tccttaccgg cttctctgtc tgaagcaatg catgtaaagt 360
caaacttcca tctttatgtg cctctcgggc acatagaatg tatgtgggaa tccaacgaac 420
aacgagctcc cagatcatct gacaggcgat ttcaggattt tctggacact ttggataggt 480
taggaacgtg ttagcgttcc ggtgtgagaa ctgacggttg gatgaggagg aggccattgc 540
cgacgacgga ggttgaggct gagggatggc agactgggag ctccaaactc tatagtatac 600
ccgtgcgcct tcgcctcgag gcgaaatccg ccgctccctt gtcttgtagt gggtgcaaat 660
gggccggacc gggccggccc agcaggaaaa gaaggcgccg actaatatta ccgcgccttc 720
ttttcctgcg agggcccggg agggtcgacc ccgagcgatt tgatgtaaag tttggtcctg 780
ctttgtatga tttatctaaa gcagcccatt ctaaagaatc cggccccggg cactataaat 840
tgctaataaa gtgcgattca ttcattggatc cacagaacgc cctgtattat cagccgcggg 900
taccacagc agtccgaca tccggaggag tgccgtggag tcgcgtaggc gaggtagcta 960
ttttgagctt tgttgcatgt atttgctttt acctgcttta cctttgggtg ctgagagacc 1020
ttatcttagt tctgaaggct cgacaaggca gatccacgga ggagctgata tttgggtggc 1080
aagctgtgga taggagcaac cctatcccta atataccagc accaccaagt cagggcaatc 1140
ccgggccatt tgttccatcg actctagtcg acc 1173
```

<210> 34

<211> 353

<212> DNA

<213> Pepper huasteco virus

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(353)

<223> V-sense promoter from Pepper huasteco virus

<400> 34

```
catatttgta ataagagagg tgtacaccga ttggagctct ttaacctggg cttattgtat 60
cgggtgtattg gtagccaata tatagtatat gggagttatc taggatcttc gtacacgtga 120
gggcatccg ttataatatt accggatggc cgaccgctta ccttatctat ccgtactgct 180
ttatttgaat taaagatggt acttttatgc tatccaatga agcgtagcgt ctgggaagct 240
tagttatcag ttccagacgt ggggaccaag tagtgtatga ccactttatt gactgtcagc 300
tttataaatt gaaattaaaa cataagtggg ccatgtacct ttaattcaaa atg 353
```



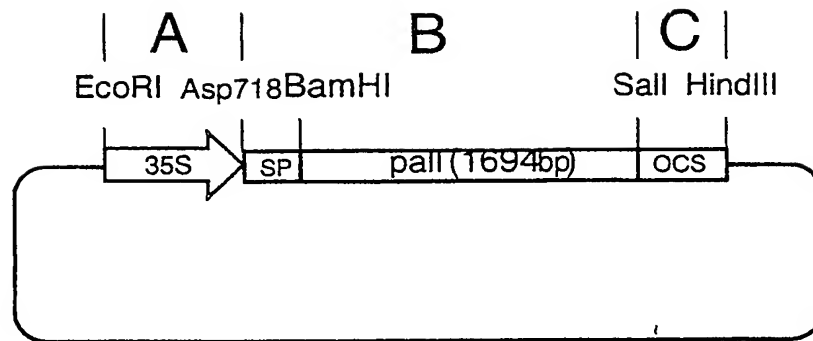


Fig.1

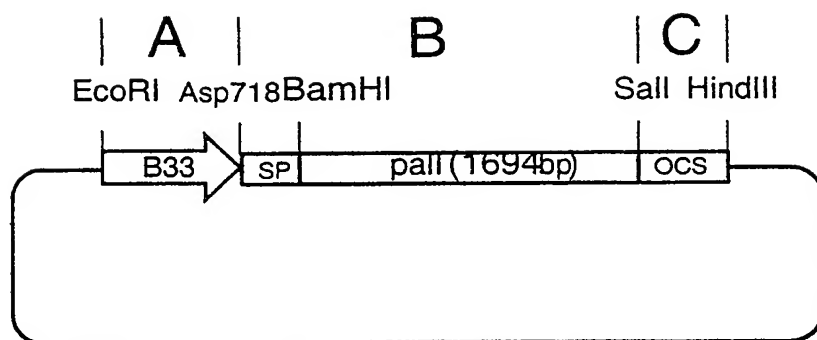


Fig. 2

WT 5 12 26 33

---



Fig.3

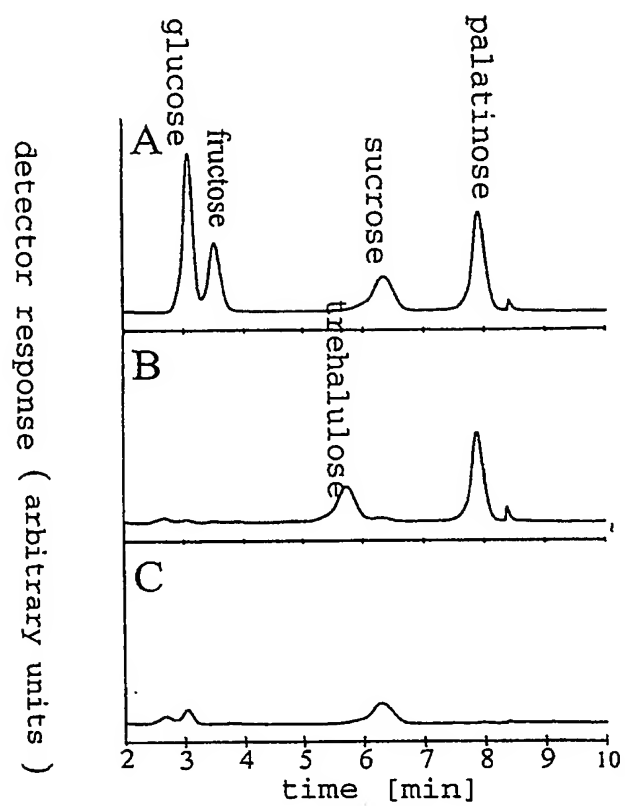


Fig. 4

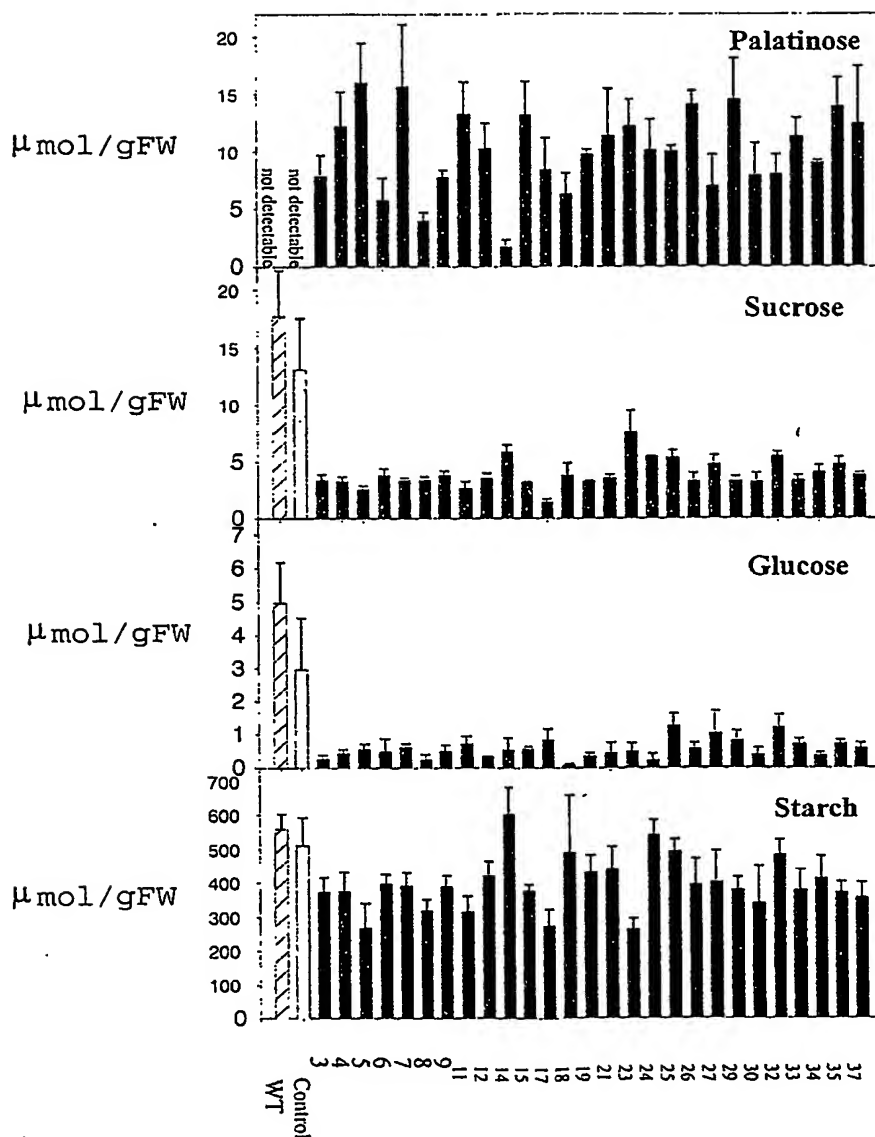


Fig. 5

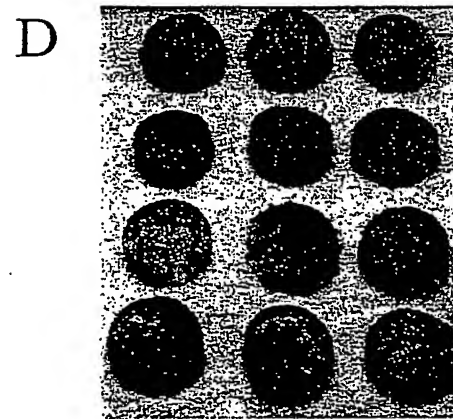
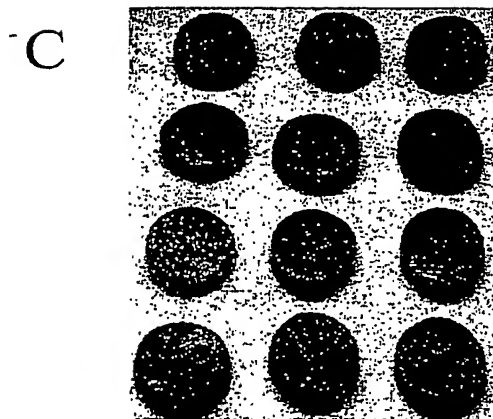
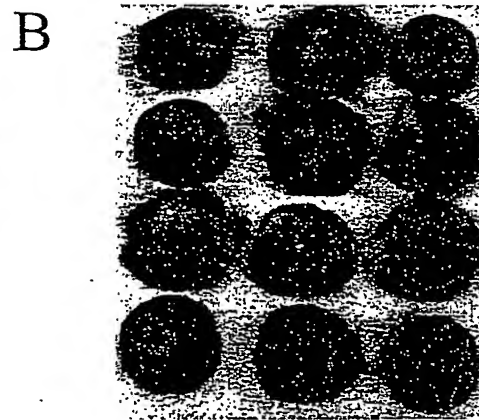
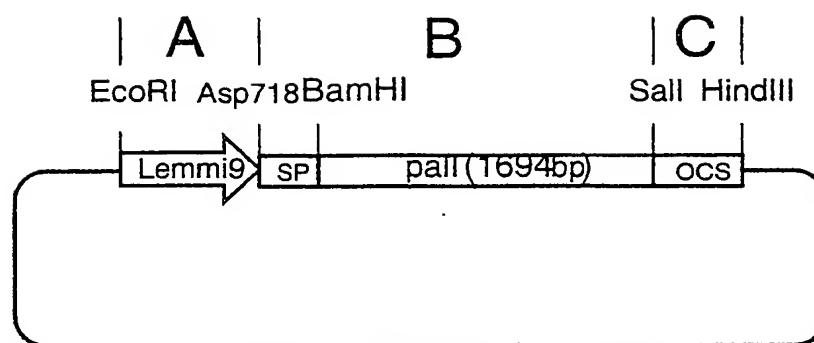
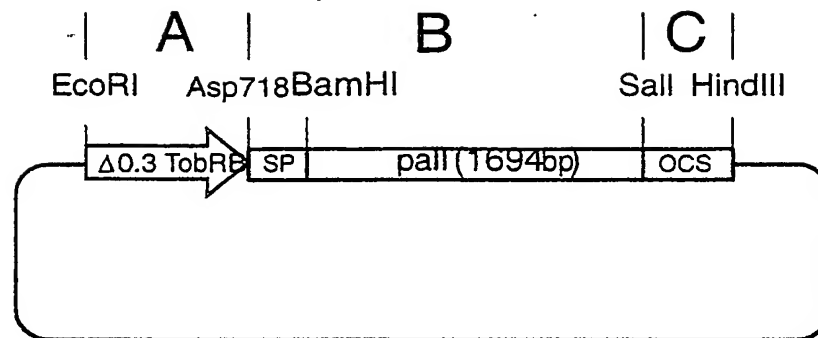


Fig. 6

**Fig.7**

**Fig.8**